Aus dem Zentrum
der Inneren Medizin
der
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
Abteilung für Physikalisch-Diätetische Therapie
Leiter: Prof. Dr. med. K. Pirlet

VERSUCHE ZUM EINSATZ DER ELISA-DIAGNOSTIK IN DER ANTI TYP IV KOLLAGEN-BESTIMMUNG BEI RHEUMATISCHEN KRANKHEITSBILDERN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Dr. rer. nat. Richard Linde
aus Herbstein

Frankfurt am Main
1984

Aus dem Zentrum
der Inneren Medizin
der
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
Abteilung für Physikalisch-Diätetische Therapie
Leiter: Prof. Dr. med. K. Pirlet

VERSUCHE ZUM EINSATZ DER ELISA-DIAGNOSTIK IN DER ANTI TYP IV KOLLAGEN-BESTIMMUNG BEI RHEUMATISCHEN KRANKHEITSBILDERN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Dr. rer. nat. Richard Linde
aus Herbstein

Frankfurt am Main 1984

Bei meinem Lehrer, Prof. Dr. med. K. Pirlet und Dr. Krippner bedanke ich mich für die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 1983 bis Oktober 1983 im Fachbereich Humanmedizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main durchgeführt.

Dekan: Prof. Dr. H.J. Müller

Referent: Priv.Doz. Dr. M. Bühring

Korreferent: Prof. Dr. P. Chandra

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523703_0038

		Seite
1.	Inhaltsverzeichnis	0
2.	Abkürzungsverzeichnis	1
3.	Zusammenfassung	2
4.	Einleitung	3
4.1	Einleitende Übersicht über rheumatische Erkrankungen Systematik und Symptome rheumatischer Erkrankungen	3
4.2	Molekularbiologischer Erkenntnisstand zur Ätiologie rheumatischer Erkrankungen	9
4.3	Strukturelemente des Bindegewebes	15
4.4	Kollagenstrukturen und ihre Pathogenese bei rheumatischen Erkrankungen	19
4.5	Hinweise zur Ätiologie von rheumatischen Erkrankungen als Autoimmunprozesse	20
5.	Materialien und Allgemeine Methoden	31
5.1	Materialien	31
5.2	Allgemeine Methoden	32
5.2.1	Ausführung der SDS-Acrylamid Elektrophorese	32
5.2.2	Färbetechnik zum Nachweis von Proteinen und zum spezifischen Nachweis von Glykoproteinen	34
5.2.3	Coating von Kollagen IV an ELISA-Platten aus Polystyrol	36
5.2.4	Durchführung des ELISA-Tests für die IgG Klasse der anti-Typ IV Kollagen Antikörper	36

Seite

5.2.5 Durchführung des ELISA-Tests für die IgM-Klasse der anti-Typ IV Kollagen Antikörper 38

5.2.6 Ausführung der durchgeführten Messungen und deren Bewertung 38

6. Ergebnis 40

6.1 Charakterisierung von Typ IV Kollagenen als Antigen durch Gelelektrophorese 40

6.2 Optimierung des Testsystems in Bezug auf die vorgelegte Antigenkonzentration 41

6.3 Zeitliche und Temperatur abhängige Optimierung der Typ IV Kollagen Adsorption an Polystyrol 42

6.4 Spezifitätstest des vorgestellten ELISA-Testsystems 43

6.5 Darstellung einer Bindekurve für ein positives und negatives Standardserum, unter optimalen Versuchsbedingungen; IgG und IgM Klassen spezifisch 44

6.6 Durchführung der Titerbestimmung für anti-Typ IV Kollagen Antikörper der Klasse IgG und IgM bei unterschiedlichen Krankheitsbildern 46

7. Diskussion 55

8. Literatur 58

2. Abkürzungsverzeichnis

A_{405}	Absorption oder Extinktion bei 405 nm
dsDNA	double stranded DNA
hnRNA	heteronukleäre RNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
B-DNA	Konformation der DNA
Z-DNA	Konformation der DNA
ANA	antinukleäre Antikörper
LE	Lupus erythematosus
ssDNA	single stranded DNA
RNA	Ribonukleinsäure
snRNA	small nuclear RNA
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IgM	Immunglobulin der Klasse M
HLA	Histokompatibilitätsantigen
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
RSA	Rinderserumalbumin
SDS	Natriumdodecylsulfat
AP	alkalische Phosphatase
TMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
S	Svedberg-Einheit
μ	Mikro, $x10^{-6}$
n	Nano, $x10^{-9}$
p	Pico, $x10^{-12}$
SnRNP	small nuclear ribonukles protein
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
RIA	Radioimmunassay
h	Zeitangabe in Stunden

3. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird ein diagnostisches Differenzierungskriterium für die breite Palette rheumatischer Erkrankungen, auch als Krankheitsformen des Bindegewebes bekannt, gesucht.
Dabei erscheint mir ein von Radioaktivität unabhängiger ELISA Test auf Typ IV Kollagen aus mehreren Gründen als geeignet:

1.) Das eingesetzte Antigen muß nicht radioaktiv markiert sein.

2.) Das Antigen wird dadurch nicht, wie beim RIA-Nachweis, chemisch modifiziert, sondern als Nativprodukt in das Testsystem eingesetzt.

3.) Es gibt keinen präzipitationsabhängigen Reaktionsvorgang, der das Ergebnis beeinflussen kann.

4.) Die Empfindlichkeit des ELISA-Tests erreicht die des RIA-Nachweisverfahrens (für höhermolekulare Substanzen im Bereich von 1 µg/l).

5.) Neben rein methodischen Aspekten besteht für Typ IV Kollagen als Basalmembranbestandteil ätiopathologisch ein enger Zusammenhang zu Krankheitsprozessen im rheumatischen Formenkreis.

Es werden mit einem indirekten ELISA-Test, mit Typ IV Kollagen als Antigen, erhöhte Antikörper der Klasse IgG bei unterschiedlichen rheumatischen Krankheitsbildern festgestellt. Das Testsystem besitzt dabei eine 'sandwich'-artige Packungsform, wobei dem Antigen der Antikörper aus dem Patientenserum aufgelagert ist,und diesem wiederum der konjugierte Antikörper für die Indikatorreaktion aufsitzt.

4. Einleitung

4.1 Einleitende Übersicht über rheumatische Erkrankungen
Systematik und Symptome rheumatischer Erkrankungen

Zu den Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises - auch als Kollagenosen bezeichnet[1] - zählt das gemeinsame Merkmal von Beschwerden am Bewegungsapparat. Da eine international anerkannte Gliederung dieser heterogenen Gruppe von Krankheiten fehlt, erweist sich die Klassifikation der American Rheumatism Association[2] als brauchbar. Es werden hierbei nicht ausschließlich Krankheiten, die direkt zum rheumatischen Formenkreis gehören, zusammengefaßt, sondern auch solche, die wegen der zugehörigen Gelenksymptomatik differentialdiagnostisch Bedeutung haben.

I Polyarthritiden ungeklärter Ätiologie:
Chronische Polyarthritis (rheumatoide Arthritis) mit Varianten (Still-Felty-Syndrom), Spondylarthritis ankylosans (Morbus Bechterew), Arthritis psoriatica, urethro-konjunktivo-synoviales Syndrom (Reiter-Syndrom)

II Erworbene Bindegewebserkrankungen (Konnektivitiden):
Generalisierter Lupus erythematodes, Pseudo-LE-Syndrom, progressive Sklerodermie, Polymyositis und Dermatomyositis, nekrotisierende Arteriitiden, Sjögren-Syndrom

III Streptokokkenrheumatismus (rheumatisches Fieber)

IV Symptomatische Arthritiden (Rheumatoide):
bei Sarkoidose, Polychondritis, Schönlein-Henoch-Purpura, Colitis ulcerosa, Enteritis regionalis, Morbus Whipple, Mittelmeerfieber, Serumkrankheit, Arzneimittelallergien

V Degenerative Gelenkerkrankungen:
Arthrosen und Spondylose

VI Weichteilerkrankungen (extraartikulärer Rheumatismus):
Pannikulitis, Pannikulose, Polymyalgia rheumatica, reaktive Myosen und Myalgien, Tendinopathien, Bursopathien, Periarthropathien, Karpaltunnelsyndrom

VII Arthritis durch bekannte Infektionserreger (Gelenkinfektion):
Septisch-eitrige Arthritis (Eiterkokken u.a., Tuberkulose), Virus- und Pilzinfektionen

VIII Traumatische und/oder neurogene Arthropathien:
Folge eines direkten Traumas, Schulter-Hand-Syndrom, Charcot-Gelenke bei Tabes dorsalis und Syringomyelie

IX Arthropathien bei metabolischen und endokrinen Störungen:
Gicht, Chondrokalzinose, Alkaptonurie, Hämophilie, Hyperparathyreoidismus, Akromegalie, Rachitis

X Gelenksymptome bei Neoplasien:
Synoviom, Myelom, Leukämie, Knochentumoren, Metastasen

XI Angeborene Bindegewebserkrankungen:
Marfan-Syndrom, Ehlers-Danlos-Syndrom, Hüftgelenksdysplasie

Gegenstand der weiteren Ausführungen soll die Kerngruppe der Polyarthritiden ungeklärter Ätiologie und die der erworbenen Bindegewebserkrankungen sein.
Als bedeutendste Erkrankung aus der ersten Gruppe gilt die chronische Polyarthritis. Die chronische Polyarthritis zeichnet sich ätiologisch durch eine immunpathologische chronische Entzündung der Innenauskleidung von Gelenkhöhlen mit symmetrischem Gelenkbefall aus. Bei schwerem Verlauf treten rheumatische Granulome im Bindegewebe

der Subcutis sowie Vaskulitiden in Erscheinung. Der chronisch progrediente Verlauf führt zu cherakteristischen Gelenkdeformitäten und Funktionsausfällen. Die Spondylarthritis ankylosans ist eine chronische Entzündung, die knorpelige Strukturanteile von Gelenken betrifft. Bevorzugter Manifestationsort dieser Krankheit sind die Iliosakral- und Schambeinfugen, die Intervertebralgelenke der Wirbelsäule mit Beteiligung des Bandapparates sowie die Extremitätgengelenke. Durch die ausgeprägte Bindegewebsschrumpfung und Ossifikation versteift sich die Wirbelsäule. Mesaortitis, Irisitis und Reizleitungsstörungen des Herzens können viscerale Manifestation des Morbus Bechterew sein. Beim Reiter-Syndrom haben wir es mit dem meist unvollständigen Symptomenkomplex aus Arthritis, Spondylarthritis, Urethritis, Konjunktivitis sowie mit Haut- und Schleimhautläsionen zu tun.
Leitsymptom der psoriatrischen Arthritis ist die Gelenkentzündung der distalen Interphalangealgelenke als assymmetrische periphere Polyarthritis. Bei der Panarteritis nodosa steht der alleinige Befall der Gefäße im Vordergrund. Mit der progressiven generalisierten Sklerodermie wird ein entzündlicher fibrotischer und schließlich degenerativer Vorgang im Bindegewebe bezeichnet. Kollagenvermehrung und Fibrosierung mit Kalziumablagerung führt zur Sklerosierung der Haut, aber auch von inneren Organen, wie Ösophagus, Darm, Herz, Lunge, Niere und kleinerer Gefäße der oberen Extremitäten.

Als Hauptvertreter in der Gruppe der Bindegewebserkrankungen imponiert der Lupus erythematodes (LE) mit Vaskulitiden der Haut und der inneren Organe bei der visceralen Variante.

Die taxonomische Aufreihung weiterer rheumatischer Erkrankungen füllt bereits diverse Lehrbücher und soll an dieser Stelle molekularen Aspekten verschiedener Kollagenosen zugeführt werden.

	SLE	Sjögren-Syndrom
Symptome bei Krankheitsbeginn	Fieber, Arthralgien, Hauteffloreszenzen	Trockenheit von Mund und Ösophagus, trockene Konjunktiva
Klinische Leitsymptome	Fieber, Polyarthritis, Hautveränderungen im Gesicht, Lymphknotenschwellungen, Serositis, Proteinurie, Nephritis	Sicca-Syndrom mit Konjunktivitis und Trockenheit des Mundes, Polyarthritis
Diagnostisches Procedere bei Verdacht	ANA Anti-DNS, Funktionsprüfungen der Niere	Klinische Untersuchung der Tränen- und Speicheldrüsen
Pathognomonische Laborbefunde	Anti-DNS, Leukopenie, Anämie, Thrombopenie, ANA, LE-Phänomen, unspez.Entzündungszeichen	ANA (70%), Anti-Speicheldrüse (60%), Anti Thyreoglobulin (45%) unspez. Entzündungszeichen
Histologische Befunde	Ablagerungen von Immunkomplexen in den Glomerula (Nierenbiopsie) u.a. Gefäßen sowie an der dermo-epidermalen Grenze (Hautbiopsie)	Entzündliche Infiltrate in Speichel- und Tränendrüsen

Tab. 1 : Differentialdiagnostische Kriterien: SLE und Sjögren-Syndrom[99)]

	Panarteriitis nodosa
Symptome bei Krankheitsbeginn	Fieber, Arthralgie, Gastrointestinale Symptome, Proteinurie, Hypertonie, Niereninsuffizienz
Klinische Leitsymptome	Hautveränderungen, Hypertonie, Proteinurie, Darmkoliken, Niereninsuffizienz, Koronarinsuffizienz, Polyneuritis, zerebrale Störungen
Diagnostisches Procedere bei Verdacht	Tiefe Hautmuskelbiopsie im Bereich von Hautveränderungen, Nierenbiopsie, Leberbiopsie
Pathognomonische Laborbefunde	Leukozytose, Neutrophilie, unspez. Entzündungszeichen, Immunkomplexe, HB_s-Ag
Histologische Befunde	Fokale fibrinoide Gefäßnekrosen unterschiedlichen Alters mit Ablagerungen von IgG, Komplement, Fibrin

Tab. 2: Differentialdiagnostische Kriterien der Panarteriitis nodosa.[99)]

	Polymyositis/ Dermatomyositis	Progressive Systemsklerose
Symptome bei Krankheitsbeginn	Muskelschwäche, proximal im Bereich der Extremitäten beginnend, Hautveränderungen, Arthralgien, Fieber	Raynaud-Phänomen, symmetrisches Ödem der Haut, der Finger und der Hände
Klinische Leitsymptome	Progrediente Schwäche der proximalen Extremitätenmuskulatur, Schluckstörungen, Verminderung der Vitalkapazität, typische (40%) und atypische (25%) Hautveränderungen, Arthralgien	Ödem, Verdickung der Haut an Händen und Füßen, zentripetal von den Extremitäten auf den Rumpf übergreifend, Schrumpfung der Haut, Gelenkversteifung, Hypomotilität des Ösophagus, Lungenfibrose, Myokardfibrose, Hypertonie, Niereninsuffizienz, Neuropathie
Diagnostisches Procedere bei Verdacht	Muskelbiopsie, Elektromyogramm	Hautbiopsie, Röntgen (Ösophagus, Lunge), Nierenfunktion
Pathognomonische Laborbefunde	Im Schub: CPK stark erhöht, ALD stark erhöht, GOT stark erhöht, unspezifische Entzündungszeichen	ANA (speckled pattern), collagen-like protein
Histologische Befunde	Fokale interstitielle Myositis mit Infiltration von mononukleären Zellen, Nekrosen, interstitielle Fibrose	Starke Vermehrung von Kollagen im Stratum reticulare der Haut, Atrophie der Anhangsgebilde, Hyalinisierung der Arteriolen, teilweise mit Vaskulitis Synovitis

Tab. 3 : Differentialdiagnostische Kriterien von Polymyositis/ Dermatomyositis und progressiver Systemsklerose 99)

4.2 Molekularbiologischer Erkenntnisstand zur Ätiologie rheumatischer Erkrankungen

Offenbar gemeinsam ist allen Kollagenosen ein Autoimmunvorgang, der sich gegen verschiedene nicht organspezifische Bindegewebsstrukturen richtet. Daraus resultiert eine Vielfalt an immunologischen Tests mit differentialdiagnostischer Bedeutung (s. Tabelle auf der folgenden Seite).

Was den möglichen immunpathologischen Mechanismus der verschiedenen Kollagenosen betrifft, so läßt sich der Lupus erythematodes als untersuchtes Modell für eine nicht organspezifische Autoimmunkrankheit anführen. Differenziert man die Antikörper von LE-Patienten im Erkrankungsstadium, so sind Antikörper gegen Histone, RNA, Protein-Ribonukleinsäurekomplexe[3)] sowie gegen dsDNA und ssDNA nachweisbar. Bei den gegen die DNA gerichteten Antikörper handelt es sich nicht nur ausschließlich gegen rechtsgedrehte DNA (B-DNA), sondern auch um solche, die gegen die linkshändige Z-DNA wirken.

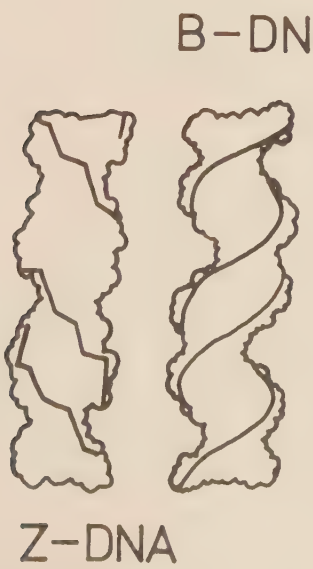

Abb. 1: Umrisse von Z-DNA und B-DNA. Die Phosphatreste sind durch dicke Striche miteinander verbunden. Bei der Z-DNA ist diese Verbindungslinie zickzackförmig und linkshändig.

Tab. 4: Differentialdiagnose bei Gelenkerkrankungen[99])

	Akute Polyarthritis	Chron.-rheum. Fieber	Spondylitis ankylo-poetica	Chron. Polyarthritis	Arthrosen
Anamn. Strept.-Inf.	+++	++	(+)	-	-
Allg. Krankheitsgefühl	+++	++	++	++	-
Fieber	+++(-)	+(-)	±	-(+)	-
BSG-Beschleunigung	+++	+++	+++	+++	-(+)
Erkrankungsalter	5-35	14-40	15-30	30-45	>50
Geschlechtsverteilung	♀♂	♀♂	♀:♂ = 1:10	♀:♂ = 3:1	♀♂
Gelenkschwellung + Schmerzen	+++	+++	(+)	+++	+
Sprunghaftigkeit	+	+	(+)	-	-
Kleine Gelenke + symm.	-	-	-	+++	±
bleibende Gelenkveränderungen	-	±	±	+++	+
Große Gelenke (Erstbefall)	++	++	(+)	(+)	±
Schweißneigung	+	+	+	+	-
Hautbeteiligung	Erythema nod. → Eryth. exs. multif. → Purpura rheumatica →			Sklerodermie	-
Pankarditis	+	+	+ Aortenvitium	fibr. Perikarditis	-
AST-Titer ↑	+++	++	(+)	-	-
Waaler-Rose-Titer↑	-	-	-	+++	-

Autoantikörper gegen Protein-Ribonukleinsäurekomplexe aus LE-Patientenserum reagieren gegen 4 Hauptklassen von Ribonukleoproteinen (RNP) mit antigener Wirksamkeit.[5] Sie werden als Sm, U1RNP, Ro und La Komplexe bezeichnet und sind zum Teil durch monoklonale Antikörper charakterisiert.[6]

Bei Antikörpern, die gegen DNA gerichtet sind, können wir 3 Populationen unterscheiden. Eine Gruppe von Antikörpern bevorzugt dsDNA, eine andere ausschließlich ssDNA und eine dritte reagiert mit beiden Formen gleich gut.[7] Antikörper, die sowohl gegen dsDNA als auch gegen ssDNA gerichtet sind, stellen hierbei den stärksten Anteil im Serum von LE-Patienten. Für das Auftreten einer Immunkomplex-Nephritis beim Lupus erythematosus ist der Anti-dsDNA Titer ein relativ spezifischer Parameter.[8),9] In diesem Zusammenhang wurden Dissoziations- und Assoziationskonstanten zwischen verschiedenen DNAs und respektiven Antikörpern bestimmt. Es konnte dabei gezeigt werden, daß Komplexe mit dsDNA langsamer dissoziieren als solche mit ssDNA.[10]

Da bei LE-Mäusen aus den Glomeruli leicht ein IgG-Antikörper mit dsDNA-Affinität eluiert werden kann, ist damit die Spezifität für einen Lupus erythematosus[11] mit Nierenbeteiligung gegeben.[12]

Bei den bereits einführend erwähnten antinukleären Antikörper (ANA) gegen Ribonukleoproteine ist die Reaktion gegen den Sm- und nRNP-Komplex kennzeichnend für den LE und andere Erkrankungen des Bindegewebes.[13),14),15]

Zur näheren Analyse dieser Ribonukleoproteinkomplexe werden mit Kalbsthymus, Kaninchenthymus oder mit Hela-Zellen als Zellaufschluß die Antigene angeboten, die dann zusammen mit dem[16),17),18] spezifischen Antikörper im Patientenserum einen präzipitierbaren Antigen-Antikörperkomplex liefern. Die Analyse des am besten untersuchten Antigen-Antikörperkomplexes aus Schweinethymus und LE-Humanserum zeigt, daß der Ribonukleoproteinpartikel aus 5 Proteinuntereinheiten besteht. Hierbei sind 4 Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von etwa 10.000 und die restliche mit

einem Molekulargewicht von etwa 12.000 vertreten. Der Ribonukleinsäureanteil zeigt etwa 10 kleine RNA-Anteile im Bereich von 4S-5S RNA.[19)]
Das untersuchte RNP-Antigen aus Schweinethymus besitzt 3 Proteinkomponenten mit einem Molekulargewicht von je $10x10^3$, einem von $12x10^3$ und einem höhermolekularen Bestandteil von $30x10^3$. Der RNA-Anteil ist - wie im Falle des Sm-Komplexes - aus 10 assoziierten RNA-Stücken im Bereich von 4-5S zusammengesetzt.[19)]
Lerner et al[20),21)] konnten im Hela Zellsystem eine nähere Differenzierung der beteiligten RNA-Stücke von Sm- und RNP-Komplexen vornehmen. Dabei konnten mit Anti-Sm Antikörper kleine nukleare RNA (snRNA) vom Typ U2-U6 präzipitiert werden. Die Kettenlänge der so erhaltenen snRNAs lag für U6 bei etwa 100, bis 200 im Falle von U2.[22)] Der Anti-RNP Antikörper präzipitiert bevorzugt U1 als snRNA im Ribonukleoproteinkomplex. Anti-Sm Antikörper reagieren somit bevorzugt mit snRNAs vom Typ U2, U4, U5 und U6, jedoch nicht mit U1. Da die gefundenen snRNAs über weite Bereiche sich mit ihrer Basensequenz bei verschiedenen Tierspezies ähneln, muß man davon ausgehen, daß es sich dabei um Abfallprodukte aus dem Processingvorgang von mRNA aus DNA handelt.
Es ist bekannt, daß nicht die gesamte DNA Information für einen Genabschnitt als mRNA-Transcript in die Translation eingeht und die Bereiche ohne Codiereigenschaften auf der DNA als Intronbereiche bezeichnet werden. Die beiden Enden dieser bis zu 1.000 Nukleotide langen Intronbereiche besitzen bestimmte 'Nonsense Bereiche', die als 'splice junctions' von Gen zu Gen identisch sind. Die Intronbereiche erscheinen noch im primären Transcript der DNA als hnRNA bezeichnet und werden später mit Restriktionsendonukleasen spezifisch gespalten sowie durch Verknüpfung der Spaltenden mit Ligasen zur Intron freien

mRNA umgewandelt.[23)]

Das 5' Ende von U1 snRNA hat hierbei eine Sequenz, die komplementär zu gewöhnlichen Sequenzen an 'splice junctions' oder Spaltstellen von hnRNA ist. Es wird daher angenommen, daß U1 aus den RNA-Spaltprodukten als snRNA hervorgeht.[24),25)]

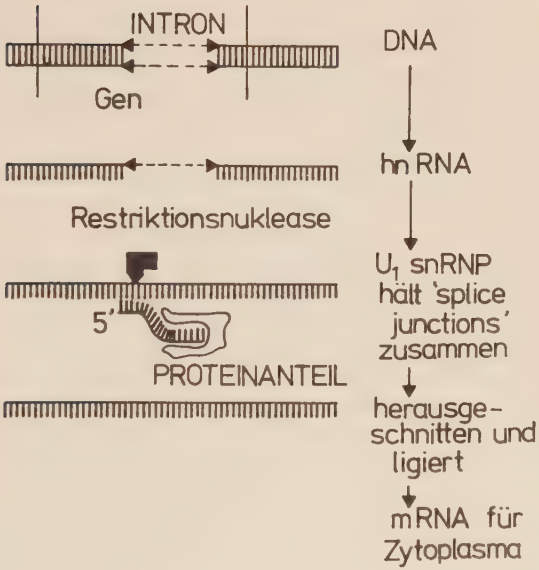

Abb. 2: Möglicher Mechanismus der RNA-Aufbereitung. Die DNA besitzt Introns, die zunächst in hnRNA transkribiert werden. Der U1 x snRNP Komplex ist mit an der Aufbereitung der hnRNA zur entstehenden mRNA beteiligt.

Das Auftreten von Antikörpern gegen Ro-Komplexe ist seit 1968 für den Lupus erythematodes und das Sjögren-Syndrom bekannt.[26] Mattioli und Reichlin entdeckten 1974 einen zusätzlich differenzierbaren Antikörper gegen das La-Antigen beim gleichen Krankheitskomplex.[27] Dabei ergab die Analyse des Ro-Antigens aus Ehrlich Ascites Tumorzellen oder HeLa Zellen neben ihrem Proteinanteil einen dreiteiligen RNA-Anteil, bestehend aus Y1, Y2 und Y3.[15] Anti-La Antikörper reagieren mit Ribonucleoprotein Partikeln, die eine heterogene Anzahl kleiner zellulärer RNAs aufweisen einschließlich einer 4,5S Form. Zusätzlich sind anit-La Antikörper in der Lage, induzierte Ribonucleoprotein Partikel nach Infektion von HeLa Zellen mit Influenza Viren zu binden. Ebenso läßt sich ein Ribonukleoprotein Komplex aus Wil_2-Zellen binden; wobei es sich hierbei um Zellen handelt, die mit dem Epstein Barr Virus infiziert sind.[15),26] Hierbei konnte aus den immunpräzipitierten Ribonukleoprotein Partikeln die für den Epstein Barr Virus codierenden EBER1 und EBER2 RNAs diagnostiziert werden.[28),5),29)30] Das gleiche Phänomen konnte Lerner et al 1979 für Zellen, die mit Adenoviren infiziert waren, finden.[5] Auch hier reagierten anit-La Antikörper mit Ribonukleoprotein Komplexen, bestehend aus den für Adenoviren codierenden VA I und VAII RNAs. Für den Lupus erythematodes ist ferner die Antikörperaktivität gegenüber verschiedenen Histonproteinen charakteristisch.[31),32),33] Bevorzugt reagieren die betreffenden Antikörper mit den Histonen H2 A und H2 B aus Kalbsthymus. Die Bindung erfolgt dabei sowohl mit IgG als auch mit IgM Antikörper und ist nicht durch andere Histone oder DNA kompetitiv beeinflußbar.[34]
Bei den Polyarthritiden mit ungeklärter Ätiologie ist der Rheumafaktor der chronischen Polyarthritis zentrales diagnostisches Bewertungskriterium. Dabei handelt es sich um ein 19 S Globulin, das mit dem körpereigenen 7 S Immunglobulin reagiert. Es wird durch seine Eigenschaft nachgewiesen, Blutkörperchen (Waaler-Rose Test) oder Latexpartikel (Latextropftest, Latexfixationstest, Latexinhibitionstest), die mit γ-Immunglobulinen beladen sind, zu agglutinieren.

Beim Waaler-Rose-Test sind Titer von 1:32, im Latexfixationstest solche von 1:80 pathologisch.[35),36),37)] Weiterhin wurden im Serum und der Synovialflüssigkeit von Polyarthritispatienten anit-Kollagen Antikörper festgestellt.[38),39)] Diese Antikörper sind gegen unterschiedliche Kollagentypen gerichtet.

4.3 Strukturelemente des Bindegewebes

Kollagenhaltiges Gewebe befindet sich im Bindegewebe und in Basalmembranen, wobei entsprechend der vielfältigen Aufgaben Unterschiede im molekularen Aufbau der Kollagene vorliegen. Im Falle der Basalmembrankollagene ist ein Typ IV[40),41)] von einem Typ V Kollagen zu unterscheiden. Typ IV Kollagen, das in Basalmembranstrukturen von Placenta und Nierengewebe mit Proteoglycanen und Laminin vergesellschaftet vorliegt, ist nicht im interstitiellen Bindegewebe vorhanden.[42),43)] Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Basalmembranen zeigen eine amorphe und nicht einheitliche Struktur mit dreischichtigem Aufbau. Am Beispiel der Glomerulomembran trennt die Basalmembran die Endothelzellen des Kapillarraumes von den Epithelzellen des Primärharnraumes. Der dreischichtige Aufbau beginnt auf die Endothelzellen folgend mit der Lamina rara interna und setzt sich zum Primärharnraum über die Lamina densa und Lamina rara externa fort.

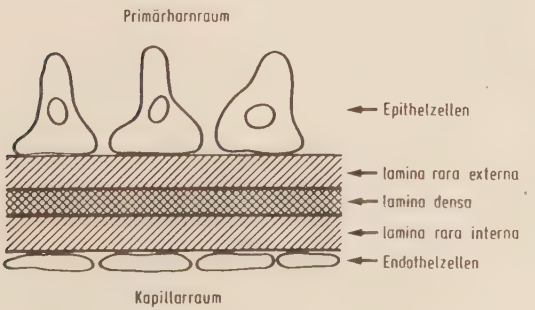

Abb. 3: Schematischer Aufbau der Basalmembran von Nierenglomeruli

Der Kontakt zu den Epithelzellen wird durch die Lamina rara hergestellt, die hauptsächlich aus Heparansulfat und Glycoproteinen aufgebaut ist.
Die Lamina densa stellt eine Permeabilitätsschranke zwischen Kapillarraum und Primärharnraum dar, mit hohem Typ IV Kollagenanteil. Teilchen mit einem größeren Durchmesser als 1onm werden hierüber zurückgehalten. Über die negativ geladenen Heparansulfate wirkt die Basalmembran zusätzlich als ionenspezifisches Filter.
Molekular setzt sich Typ IV Kollagen aus 2 verschiedenen α-Ketten zusammen. Es handelt sich hierbei um strukturell voneinander verschiedene Ketten, da beispielsweise α1(IV) und α2(IV) immunologisch schwach miteinander kreuzreagieren.[44] Beide Ketten sind über Disulfid-Brücken miteinander verknüpft und besitzen jeweils ein Molekulargewicht von 160.000-180.000. Mit der CD-Spektroskopie konnte eine Tripelhelixstruktur für Typ IV Kollagen festgestellt werden. Die hieraus abzuleitende Annahme zur Stöchiometrie von 2 identischen und einer hiervon verschiedenen Kette konnte für Typ IV Kollagen aus der Nierenrinde von Rindern nachgewiesen werden. Für das so isolierte Typ IV Kollagen mit einem Molekulargewicht von 380.000[45] wurde die Kettenzusammensetzung $(C\text{-}1)_2$ (D-1) bzw. $(\alpha 1)_2$ $(\alpha 2)$ gefunden.[46] Die etwa 390nm langen Typ IV Kollagenmoleküle sind untereinander über einen 30nm langen Bereich, auch als 7S Domäne bezeichnet, zu einem Kollagenpaket von 4 Kollagentripelhelices verknüpft. In diesem Bereich haben die Kollagenmoleküle globuläre Anteile und senden seitlich ihre Spinnenarmstrukturen in tripelhelikater Struktur aus.

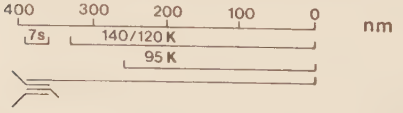

Abb.4: Schematische Darstellung der Lage der 330 und 260 nm langen Molekül-Fragmente innerhalb des Typ IV Koll.Moleküls

Abb. 5: EM-Aufnahmen des Antikörper/Antigen-Komplexes nach Inkubation von polymerem Typ IV-Kollagen mit monoklonalen Antikörpern

In der kovalenten Verknüpfung weiterer Molekülaggregate entsteht eine räumliche Netzstruktur.[47]

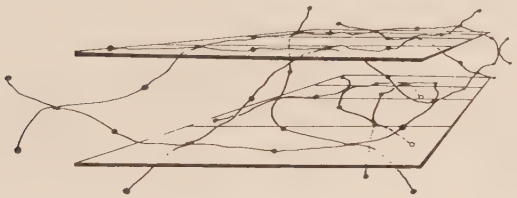

Abb.6 : Schematische Darstellung des Raumnetzmodells von Typ IV Kollagenen

Was die Antikörperbindestelle an Typ IV Kollagen betrifft, so zeigen elektronenmikroskopische Untersuchungen eine bevorzugte Bindestelle für monoklonale anti-Typ IV Kollagen Antikörper 45-63 nm von der 7S-Domäne entfernt.[47),48)] Als weiterer Vertreter von Basalmembrankollagenen gilt das Typ V Kollagen, das Bestandteil von bronchialen Epithelzellmembranen ist und sowohl Bestandteil des alveolen und kapillaren Basalmembrananteils ist. Es wird daher angenommen, daß es sich hierbei um ein mit Zelloberflächen assoziiertes Kollagen handelt. Immunologisch zeigt das auch als AB_2-Kollagen bezeichnete Typ V Kollagen keine Kreuzreaktion mit Typ IV Kollagen.[40),49)]

Die Gruppe der interstitiellen Kollagene umfaßt die Typ I, II und III Kollagene. Die langgestreckten Moleküle sind tripelhelikal aufgebaut und 297 nm lang. Die Untereinheiten der tripelhelikalen Moleküle sind 3 identische α-Untereinheiten. Wichtige Voraussetzung für die Ausbildung der Tripelhelix ist, daß jede dritte Aminosäureposition durch ein Glycin besetzt ist und die Struktur durch einen hohen Prolin- und Hydroxyprolingehalt stabilisiert wird.

An beiden Enden der Tripelhelix befinden sich kurze, nicht helikale Telopeptide, die je nach Kollagentyp und Gewebe 14-25 Aminosäurereste lang sind. In diesem Bereich werden die einzelnen Tripelhelices miteinander quervernetzt.
Ein weiteres Charakteristikum für die interstitiellen Kollagene ist die Zusammenlagerung zu Fibrillen in einer gegeneinander versetzten Form. Verantwortlich dafür ist die Anordnung polarer und hydrophober Aminosäuren entlang

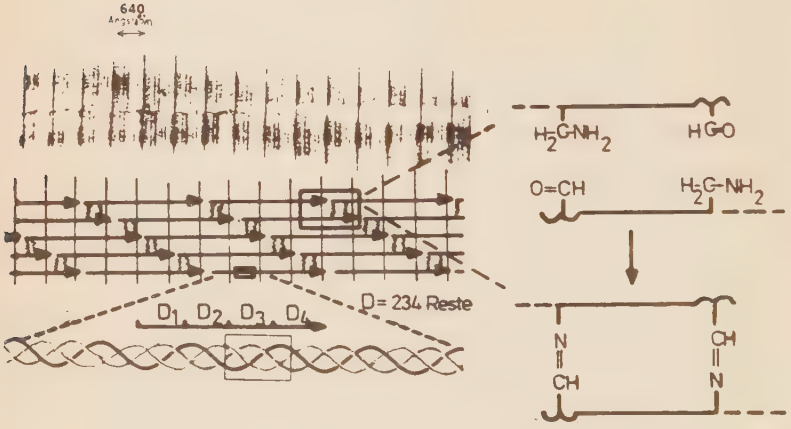

Abb. 7 : Schematische Darstellung der Fibrillenbildung sowie der Quervernetzung einzelner Tripelhelices von intestitiellem Kollagen

der Proteinkette. Die periodische Verteilung dieser Aminosäuren führt zu einer Unterteilung der Tripelhelix in 4 D Einheiten, die jeweils 234 Reste lang sind. Diese Einheiten sind in Bezug auf ihre interaktiven Aminosäuren homolog und zwingen die Moleküle zu einer um D versetzten parallelen Anordnung. Dadurch wird eine maximale Wechselwirkung der hydrophoben und polar geladenen Aminosäuren benachbarter Moleküle erreicht.

4.4 Kollagenstrukturen und ihre Pathogenese bei rheumatischen Erkrankungen

Die Bedeutung der unterschiedlichen Kollagentypen als Autoantigene bei verschiedenen Bindegewebserkrankungen konnte von mehreren Arbeitskreisen bestätigt werden. Andriopoulos et al konnte beispielsweise Typ I Kollagen als Autoimmunkomponente bei der chronischen Polyarthritis zuordnen.[50] Des weiteren können beim manifesten Emphysem und der Sklerodermie Typ I Kollagen Antikörper nachgewiesen werden.[51]

Eine Typ II Kollageninjektion in Ratten vermag durch Aktivierung der zellulären und humoralen Immunität eine Arthritis auszulösen.[52),53] Die Auslösung einer Arthritis war auch möglich durch Serumübertragung von immunisierten Tieren auf nicht immunisierte Empfänger. Damit konnte demonstriert werden, daß nicht nur Typ II-Kollagen, sondern auch der respektive Antikörper (anti-Typ II Kollagen Antikörper) an der Ätiologie der Arthritis beteiligt sein kann.[55]

Nach Injektion von Antikörper gegen Typ IV Kollagen aus Kaninchen in Mäuse lassen sich die Antikörper immunpathologisch auf der alveolären Basalmembran ähnlich der histopathologischen Frühphase eines Goodpasture Syndroms nachweisen.[57),54]

Mackel et al konnte bei Sklerodermiepatienten mit diffuser interstitieller Lungenerkrankung erhöhte Antikörperspiegel gegen Typ I und IV Kollagen messen.[51]

Für die chronische Polyarthritis und andere rheumatische Erkrankungen wurden erhöhte Antikörperspiegel gegen Typ I, II, III, IV und V gemessen.[56]

Im Falle des Typ IV Kollagens konnte bei rheumatischer Arthritis, Gicht und degenerativen Gelenkerkrankungen eine um etwa 20-25 % erhöhte Antikörperbindung gegenüber Normalseren registriert werden.

4.5 Hinweise zur Ätiologie von rheumatischen Erkrankungen als Autoimmunprozesse

Bringt man alle über Bindegewebserkrankungen bekannten Fakten mit in den immunologischen Erkenntnisstand ein, so kommen diverse Entstehungsmöglichkeiten für diesen Krankheitskomplex in Frage:

- Freisetzung verborgener Antigene
- Verminderte Suppressor T-Zellfunktion
- Gesteigerte Helfer T-Zellaktivität
- Thymusdefekte
- Anwesenheit abnormaler B-Zellklone
- Polyklonale B-Zellaktivierung
- Stammzelldefekte
- Defekte des Idiotypen-anti-Idiotypen-Netzwerkes
- Virale Faktoren
- Hormonale Faktoren
- Defekte von Makrophagen
- Abnormale Gene: Ir Gene, Ig Gene oder HLA- und DR-Gene.

Da ein Großteil der angesprochenen Aspekte immunologischer Natur ist, wird ein kleiner Exkurs in den Bereich der körpereigenen Abwehr notwendig.
Das Immunsystem besitzt eine zelluläre Abwehrform mit dem T-System und eine humorale mit dem B-Zellsystem. Genetisch zeigt eine immunkompetente Zelle eine getrennte DNA Niederschrift für die leichten und schweren Ketten der jeweiligen Antikörper. Dabei fallen etwa 150 getrennte variable Gene auf, die mit 5 kombinierbaren Verknüpfungssequenzen (Joining Sequenzen) und einem C-Gen für den konstanten Antikörperteil, bei zusätzlich 10-facher Rekombinationsmöglichkeit, ein Kombinationsmodell mit 7.500 Möglichkeiten für die Synthese einer leichten Antikörperkette zulassen.

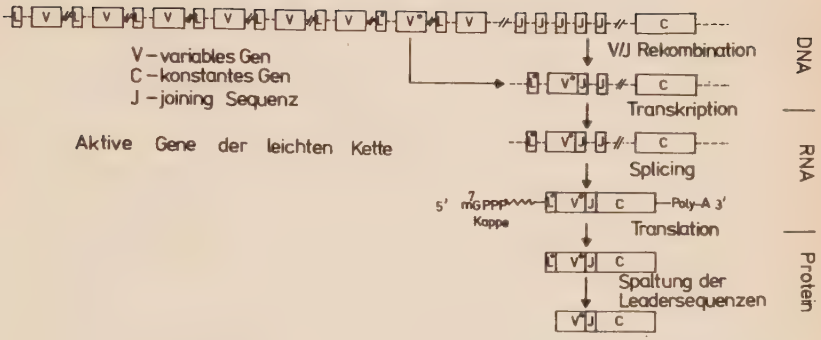

Abb. 8 : Gene, die für die Bildung von leichten Ketten codieren, dargestellt mit mRNA Processing. Bezeichnung * steht für ein herausgegriffenes Beispiel.

Für die schweren Ketten ergeben sich durch Kombination von 80 variablen Genen (V-Genen) mit einer von 6 bekannten Verknüpfungssequenzen (Joining Sequenzen) und mit 50 D-Genen sowie einer zusätzlichen genetischen Rekombinationsflexibilität von 100 die Möglichkeit zur Herstellung von ca. 2,4 Millionen verschiedenen schweren Ketten innerhalb einer Antikörperklasse. Leichte und schwere Ketten haben die potentielle Fähigkeit zur Synthese von etwa 18 Billionen unterschiedlichen Antikörpern einer Klasse. Das Klassenkennzeichen für Antikörper wird durch 8 unterschiedliche C-Gene exprimiert.[57)]

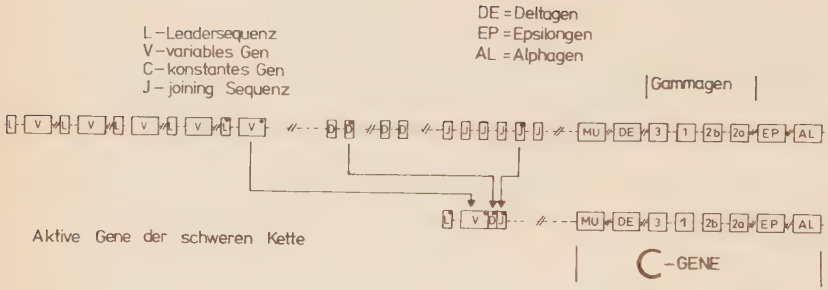

Abb. 9 : Gene, die an der Aktivierung der schweren Ketten beteiligt sind; im Vorgang der Zusammenstellung (Assembly's)

Die Antikörpersynthese ist auf zellulärem Niveau mit der exakten Differenzierung der hierfür kompetenten Zellen verknüpft. In der ersten Phase der Reifung bildet der betreffende Prä-B Lymphozyt durch Transkription der schweren Kette mit zugehörigem Mu-Gen eine Kette, die sich später mit der synthetisierten kleinen Kette zu einem IgM Antikörper assoziiert. Anschließend läuft die Transkription einer schweren Kette mit zugehörigem Delta-Gen an. Das IgD als Eiweißprodukt hieraus und das entstandene IgM sind oberflächenständig auf dem reifen B-Lymphozyten nachweisbar. Beide Antikörper sind gegen das gleiche Antigen gerichtet und besitzen den gleichen variablen Bereich. Die folgenden Schritte in der Lymphozytenreifung sind Antigen bestimmt. Der hierbei ablaufende erste Reaktionsschritt wird als clonale Selektion bezeichnet. Dabei induziert das an die Oberflächenantikörper am besten bindende Antigen, bei einem aus der Vielzahl der bereitgestellten Prä-B Lymphozyten, einen Proliferationsreiz. Die angesprochene Zelle wird nach Antigenkontakt in der zweiten Phase der Reifung

zur Mutterzelle für den passenden B-Lymphozytenklon mit entsprechendem Antikörperprodukt. Im Verlauf der B-Zellreifung verschwinden IgD und IgM-Antikörper von der Zelloberfläche und es wird entweder IgM, IgG, IgE oder IgA von der so entstandenen Plasmazelle synthetisiert.

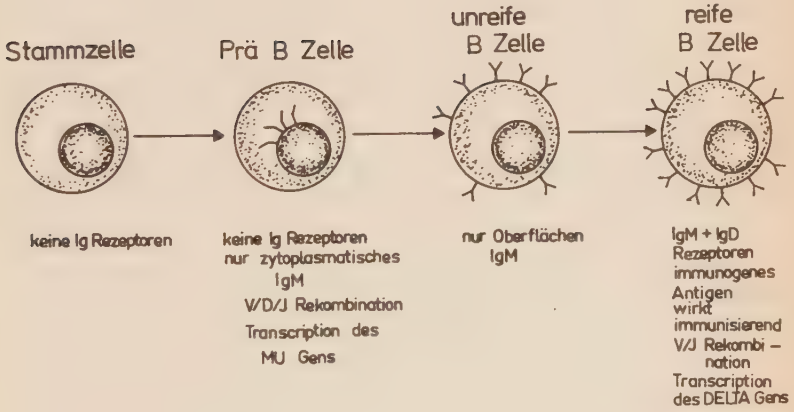

Abb.10 : Modell der B-Zellreifung von der Stammzelle zur Plasmazelle

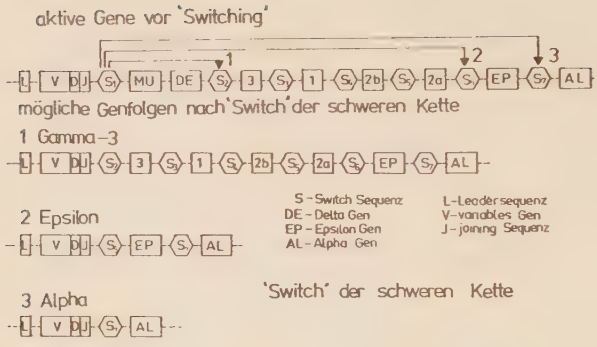

Abb. 11 : Heavy-Chain Class Swicht; gilt als Umschaltmodell zur Herstellung verschiedener Immunglobulin Klassen

Mulekular spielt sich dieser Vorgang, auch als 'heavy chain schwitch' bekannt, durch selektives Ankoppeln von Genen des konstanten Antikörperbereiches an die V/D/J Sequenz ab. Statt des für IgM codierenden Mu-Gens wird beispielsweise das Epsilon-Gen an die V/D/J Sequenz angehängt. Der Übergang von der anfänglichen IgM zur IgE Synthese in der Plasmazelle ist vollzogen. Im T-Zellbereich sind die Entwicklungsvorgänge wesentlich unklarer. Die Reifungsvorgänge sind auf die Erkennung der eigenen Histokompatibilität ausgerichtet und laufen im Thymus ab. Hierbei werden sowohl Thymusantigene der Klasse I (A-, B- und C-Antigene) des HLA-Systems, als auch die der Klasse II (D-, R-Antigene) beim Menschen erlernt. Die Stammzellen, die später den Thymus verlassen, haben zur eigenen Histokompatibilitätserkennung Rezeptoren als programmierte Erkennungseinheiten für körpereigenes Material. Die Rezeptoren der Stammzellen sind entweder gegen Antigene der HLA-Gruppe oder gegen solche der D- und R-Antigengruppe gerichtet. Stammzellen mit anti Klasse I Rezeptoren differenzieren später zu cyto-

toxischen Zellen, während die mit anti Klasse II Rezeptoren versehenen zu T-Helferzellen werden. Im weiteren Verlauf der Stammzelldifferenzierung entfernen sich T-Zellen mit geringer Rezeptorbindung an Histokompatibilitätsstrukturen aus dem Thymus. Diejenigen mit einer hohen Bindung werden eliminiert.[58),59),60)] Der T-Zellreifung zur T-Helferzelle geht der Kontakt mit antigenhaltigen Makrophagen oder antigenhaltigen Zellen voraus. T-Suppressorzellen proliferieren nach Kontakt mit löslichem Antigen ebenso.[61),62)]
Bezüglich ihrer späteren Aufgabenstellung muß davon ausgegangen werden, daß die beiden differenzierenden Zelltypen zwei funktionell verschiedene Rezeptoren besitzen, mit denen zum einen die eigene Histokompatibilität und zum anderen hiervon verschiedene Antigendeterminanten abgegriffen werden.[60),63)] Reife B- und T-Lymphozyten kooperieren untereinander in einem immunologischen Regelkreis, wobei die T-Helferzellen sowohl auf die Antikörperbildung durch Plasmazellen als auch auf die Makrophagenbildung und die Bildung von Killerzellen aus cytotoxischen Zellen positiv einwirken.
Die T-Suppressorzellen üben einen negativen Einfluß auf die Antikörperbildung und die Bildung von Killerzellen aus cytotoxischen T-Zellen aus.[64),65)]

Aus dem kurz umrissenen immunologischen Kenntnisstand ergibt sich eine große Fülle an Erklärungsmöglichkeiten für die Ätiologie rheumatischer Erkrankungen als mögliches Autoimmungeschehen. Dabei ist leicht vorstellbar, daß unter normalen Umständen verdeckt liegende Gewebsstrukturen, wie Typ II Kollagen oder Typ IV Kollagen, immunologisch zugänglich werden.[66),67)] Eine verminderte T-Suppressor-Zellfunktion oder die Abnahme von T-Suppressorzellen könnte auch eine Entgleisung der Antikörperbildung gegen gewisse Alloantigene von Zelloberflächen zur Folge haben.[68),69),70)] So konnte bei LE-Patienten ein relatives Überwiegen der Antikörper bildenden Zellen durch erhöhte anti-Lymphozyten Anti-

körpertiter, die maßgeblich gegen T-Suppressor Zellen gerichtet waren, festgestellt werden.[71),72),72a)] Umgekehrt ist vorstellbar, daß die T-Helfer Zellaktivität die der Suppression im immunologischen Regelkreis überwiegt; mit dem daraus resultierenden Krankheitswert.[73)] In diesem Zusammenhang konnte am Tiermodell gezeigt werden, daß Faktor abhängig das Erkennungsgleichgewicht zwischen 'fremd' und 'eigen' auf der T-Zell Erkennungsebene verschiebbar ist.

Exogenes Interleukin - 2 (IL-2) hat in vitro stimulierende Wirkung auf die Proliferation von T-Helferzellen und auf cytotoxische T-Lymphozyten. Eine Toleranzaufhebung auf T-Zellniveau gegenüber körpereigenen Strukturen ist auch - wie bereits angedeutet - durch Veränderung von zelleigenen Oberflächenstrukturen denkbar. Dabei sind solche Vorgänge für Medikamente wie Hydralazin, Isoniazid oder Procainamid als pharmakologisch induzierter Lupus erythematodes nachgewiesen.

Ein diskutierter Thymusdefekt mit bevorzugtem Befall der Rindenregion als mögliche Ursache für den LE konnte bisher nur am Mäusemodell verifiziert werden.[74)]

Als möglicher Mechanismus bei der LE-Entstehung könnte auch die polyklonale B-Zell Aktivierung in Frage kommen. Es handelt sich hierbei um eine autoreaktive B-Zell Aktivierung ohne T-Zell Beteiligung. Wahrscheinlich wird durch endogene oder exogene Mitogene, auch als polyklonale Aktivatoren bezeichnet, dieser Vorgang eingeleitet. Bakterien, Viren und andere Substanzen können möglicherweise B-Zell Aktivatoren darstellen.[74),75)] Bekannt ist jedoch, daß bakterielles Lipopolysaccharid die Bildung von anti-DNA, anti-γ-Globulinen und anti-Erythrozyten Autoantikörper zunächst der IgM Klasse und später nach Gewebsschädigung auch der IgG Klasse auslösen kann.[76)]

Defekte im Idiotypen-Antiidiotypen Geflecht kann auch die Erklärung für immunologische Fehlsteuerungen bei rheumatischen Erkrankungen sein. Es handelt sich dabei um einen immunologischen Reaktionsmechanismus, der 1974 von Jerne vorgeschlagen wurde. Ausgangspunkt der Überle-

gungen ist, daß ein Antikörper mit spezifischer variabler Region mit seinem respektiven Antigen, als Idiotyp bezeichnet, reagiert. Der entstandene Komplex aus Antikörper und Antigen seinerseits kann ebenfalls als antigener Reiz wirken und in der Folge zur Auslösung einer Autoimmunantwort führen. Die Folge ist das Entstehen eines Clusters aus Idiotypen - anti Idiotypen mit noch weiter laufenden Reaktionsketten.[77),78)]

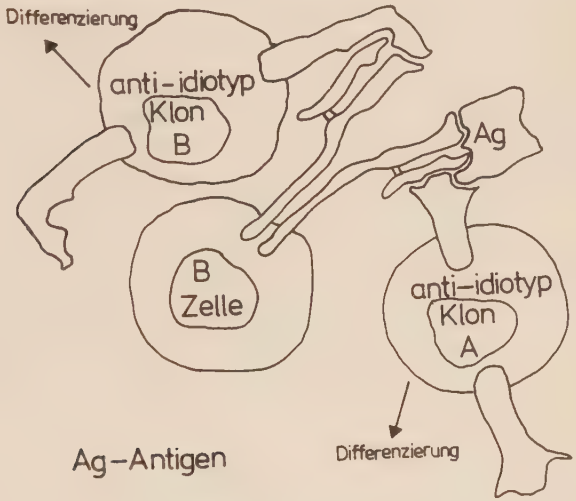

Abb. 12: Modell des Idiotyp - anti Idiotyp Mechanismus des Autoimmunprozesses. Regionen des B-Zell Antikörpers können in Anwesenheit oder Abwesenheit des Antigens zu verschiedenen anti-Idiotyp Klonproliferationen führen.

Damit dieses Netzwerk von Idiotyp mit anti-Idiotyp seine Funktionsfähigkeit beibehält und nicht ungebremst weiterläuft, sind suppressive Steuerungen nötig, um die Proliferation aberranter Clone zu verhindern. Experimentell wurde dieses immunologische Modell bisher an Mäusen demonstriert, die mit T-Zell abhängigen Antigenen, wie

Phosphorcholinester, bakteriellem Levan oder Trinitrophenyl (TNP)-Ficoll immunisiert wurden.[79),80),81)]

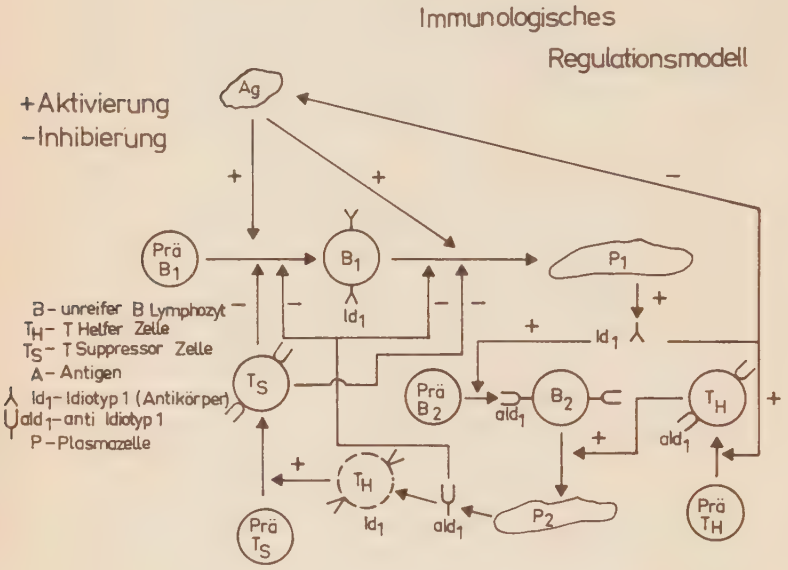

Abb. 13: Regulationsmodell mit Einbeziehung der Idiotyp-anti Idiotyp Modell-Vorstellung

Der geschilderte immunologische Reaktionsmechanismus macht es vorstellbar, daß ein entstehender anti-Idiotypen Antikörper als 'internes Spiegelbild' die Antigenstruktur vollständig oder teilweise imitiert und rückwirkend die Bildung des zugehörigen Idiotypen ungehemmt weiterlaufen läßt.[82)]

Bezogen auf das Idiotyp anti-Idiotyp Reaktionsnetz werden sogenannte 'enhancing Antikörper' zusätzlich dafür verantwortlich gemacht, die Antigen-Antikörperreaktion zu forcieren. Diese Antikörper sind auf die Erkennung von antigenen Determinanten aus Antikörper-Antigen Kom-

plexen spezialisiert. Man nimmt in diesem Zusammenhang an, daß der Rheumafaktor, als ein gegen IgG gerichteter IgM-Antikörper, aus 'enhancing Antikörper' bildenden B-Zellen stammt.[83] Neben aberranten Immunreaktionen als Erklärung für die Ätiologie rheumatischer Erkrankungen sind Hinweise auf die genetische Disposition vorhanden. Hierbei sind die Histokompatibilitätsmerkmale, als HLA- und DR-Vertreter, ein guter Indikator. Beim Morbus Bechterew ist das B 27 Merkmal aus dem HLA-System auffällig.[84),85] Die chronische Polyarthritis ist unabhängig vom HLA-System und besitzt eine Beziehung zum DR 4 Merkmal. Mit dem Lupus erythematodes korreliert das HLA-Merkmal B 8 zusammen mit dem von DR 2 und DR 3.[86),87] Einen hohen Grad an Übereinstimmung besitzen rheumatische Erkrankungen mit Defizienzen im Komplementsystem. LE-Patienten weisen dabei eine hohe Inzidenz für C1r, C1s oder C3 Defizienzen auf.[86),87] Bei dem genetischen Mitverschulden von Autoimmunkrankheiten spielt auch die geschlechtsgebundene Vererbung eine ebenso entscheidende Rolle. So ist zum Beispiel bei Frauen nach der Pubertät für den LE die Inzidenz 9 mal so hoch als die der Männer. Andere Autoren bringen dies mit der weiblichen Hormonsituation in Zusammenhang, wobei der chronischen Östrogenstimulation eine wichtige Rolle in der Prävalenz des LE bei der Frau beigemessen wird.[88] Eine virale Genese bei der chronischen Polyarthritis oder dem LE, als Vertreter einer Autoimmunkrankheit, konnte durch epidemiologische Studien für den viel diskutierten Epstein-Barr Virus (EBV) nahezu ausgeschlossen werden.[89] Auch für virusartige C-Typ Partikel konnte der Verdacht,beim LE mitbeteiligt zu sein, nicht erhärtet werden, so daß man in diesem Falle auf den Experimentierstand mit Inzuchtmäusen (NZB-Mäusen) verweisen muß.[90] Im Tierversuch mit NZB-Mäusen läßt sich der LE analog zum Menschen modellhaft untersuchen. Biochemisch konnte aus dem Gewebe und dem Serum der betroffenen Mäuse ein C-Typ RNA Virus mit einem gp 70 Glycoprotein als Hauptbestandteil der Hülle nachgewiesen werden. Der Bezug zur Pathogenese besteht

in der Korrelation von hohen gp 70 Konzentrationen mit dem Auftreten von Antikörper gegen Kernantigene sowie der spezifischen Antikörperablagerung entlang der Glomeruli während einer spontanen Lupus Nephritis.[91)]
Im Vergleich von normalen Mäusestämmen mit LE-Mäusen, fallen letztere durch zirkulierende gp 70 - anti gp 70 Komplexe auf.[92),93)] Solche Komplexe sind pathogenetisch für die Glomerulonephritis von (NZB x NZW) F_2 Mäusen nachgewiesen.[94)]

Resümiert man über den bisherigen Kenntnisstand zur Ätiologie von rheumatischen Erkrankungen, so ist ein Großteil der Erkenntnisse zwar phänomenologisch erschlossen, aber nicht molekular zusammenhängend verstanden.
Gleiches kann über die abgrenzende Diagnostik rheumatischer Erkrankungen gesagt werden.
Es ist daher von großer medizinischer Bedeutung, durch gezielte Verfahren Transparenz in diesen Krankheitskomplex zu bringen. Diese Arbeit soll hierzu einen kleinen Beitrag liefern.

5. Materialien und Allgemeine Methoden

5.1 Materialien

Typ IV Kollagen aus humaner Plazenta	Sigma, Chemie-GmbH, 8028 Taufkirchen
Rinderserumalbumin Fraktion	Sigma, Taufkirchen
Anti-Human-IgG/AP-Konjugat	Behringwerke AG, Marburg
Anti-Human-IgM/AP-Konjugat	Behringwerke AG, Marburg
Substrattabletten für AP-Reaktion	Merck, Darmstadt
Pufferlsg. für AP-Reaktion	Merck, Darmstadt
Acrylamid	SERVA, Heidelberg
Methylen-N, N'-bisacrylamid N, N, N', N'- Tetramethyläthylendiamin	SERVA, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blau, R 250	SERVA, Heidelberg
Bromphenolblau	SERVA, Heidelberg
Natriumdodecylsulfat	SERVA, Heidelberg
Dynatech Flut Bottom Microelisa plates immulon (Polystyrolplatten)	Dynatech

5.2 Allgemeine Methoden

5.2.1 Ausführung der SDS-Acrylamid Elektrophorese

Zur näheren Charakterisierung des Typ IV-Kollagens wird eine SDS-Gelelektrophorese durchgeführt.[95] Dabei werden die Proteinproben in Auftragspuffer aufgenommen.

Auftragspuffer:
- 2,42 g Tris
- 1,24 g Borsäure
- 20 g SDS
- 120,12 g Harnstoff
- 6 ml Bromphenolblau

aufgefüllt auf 1 l mit Wasser.

Die optimale Auftragsmenge liegt bei 10-50 µl der vorbereiteten Proteinlösung mit einer späteren Proteingesamtkonzentration von etwa 10-20 µg pro Probe.
Vor dem Auftragen der Proteinproben muß etwa bei 37°C, 2h jede Probe inkubiert werden. Es besteht hier die Möglichkeit, mit 1 % β-Mercaptoäthanol zusätzlich reduzierend zu inkubieren.
Die Gelplatte besitzt für das Trenngel eine Gelstärke von 5 % und wird aus 3 verschiedenen Lösungen hergestellt:

Lösung A:
- 30 g Acrylamid
- 0,6 g Bis-Acrylamid
- aufgefüllt auf 100 ml mit H_2O

Lösung B:
- 4,64 g Borsäure
- 12,114 g Tris
- 0,3 ml TMED
- aufgefüllt auf 100 ml mit H_2O

Lösung C:
- 1 g Ammoniumperoxodisulfat
- aufgefüllt auf 100 ml mit H_2O.

In folgender Reihenfolge wird das Trenngel zur gebrauchsfähigen Lösung zusammengestellt:

1.) 16,7 ml Lsg. A
2.) 10 ml Lsg. B
3.) 5 ml 2%-ige SDS Lsg.
4.) 5 ml Lsg. C
aufgefüllt auf 100 ml H_2O.

Zur Überschichtung der gegossenen Platte wird ein Spacer-Gel verwandt. Dieses Gel besitzt eine größere Porenweite. Dabei ist ein Einwandern von Molekülen mit sehr hohen Molekulargewichten weg von der Auftragsstelle in das Gel gewährleistet. Die Einzellösungen für das Spacer-Gel sind wie folgt:

Lösung A: 10 g Acrylamid
0,26 g Bis-Acrylamid
aufgefüllt auf 100 ml mit H_2O

Lösung B: 12,1 g Tris
0,3 ml TMED
aufgefüllt auf 100 ml mit H_2O und eingestellt auf pH von 6,8 mit HCl

Lösung C: 1 g Ammoniumperoxodisulfat
aufgefüllt auf 100 ml mit H_2O

Die gießfähige 3%-ige Gellösung hat die folgende Zusammensetzung:

1.) 3 ml Lsg. A
2.) 1 ml Lsg. B
3.) 0,5 ml 2%-ige SDS Lsg.
4.) 0,5 ml Lsg. C
aufgefüllt auf 10 ml mit H_2O.

Der Stammpuffer zur Herstellung des Kammerpuffers setzt sich zusammen aus:

46,4 g H_3BO_3 (Borsäure)
121,1 g Tris
10 g SDS
aufgefüllt auf 1 l mit H_2O.

Als Kammerpuffer wird der Stammpuffer 1 : 10 mit H_2O verdünnt. Die Elektrophorese wird mit einem LKB 2117 Multiphor - Gerät bei 11°C und 110V in 4h durchgeführt.

5.2.2 Färbetechnik zum Nachweis von Proteinen und zum spezifischen Nachweis von Glykoproteinen

Die einfache Proteinfärbung wird mit 1,25 g Coomassie Brilliant Blau, R 250 in 454 ml 50%-igem Methanol und 46 ml Eisessig durchgeführt. Entfärbt wird in Entfärberlösung, die 75 ml Essigsäure, 50 ml Methanol und 875 ml H_2O enthält, bis die Banden deutlich zu sehen sind und der Geluntergrund transparent erscheint. Das Nachweisverfahren für Glycoproteine bezieht die chemische Erfassung von Zuckerresten ein.[96] Dabei muß zunächst überschüssiges SDS über Nacht mit einer Fixierlösung aus 25 % Isopropanol und 10 % HOAC entfernt werden. Die Fixierung wird anschließend mit 10 % Isopropanol und 10 % HOAC für 2-5h fortgesetzt und danach mit der Inkubation in 10 % HOAC für 1-2h abgeschlossen. Zur Stabilisierung der zu Carbonylgruppen oxidierten vicinalen Hydroxylgruppen von Zuckerresten schließt sich eine Behandlung von 0,5 % Na-Arsenit in 5 % HOAC für 30-60 Minuten an. Es folgt eine zweimalige 20-minütige Inkubation mit 0,1 % Na-Arsenit in 5 % HOAC. Nach einer 15-minütigen Eisessigbehandlung ist das Gel für den endgültigen Färbeschritt vorbereitet.
Die Reaktion mit dem Schiffreagenz, bestehend aus

2,5 g basischem Fuchsin in 500 ml H_2O
5,0 g Natriummetabisulfit $Na_2S_2O_5$
50 ml 1N HCl,

wird über Nacht durchgeführt.
Eine anschließende Behandlung mit 0,1 % $Na_2S_2O_5$ in 10 mM HCl garantiert eine Intensivierung der Bandenfärbung und eine Untergrundentfärbung.

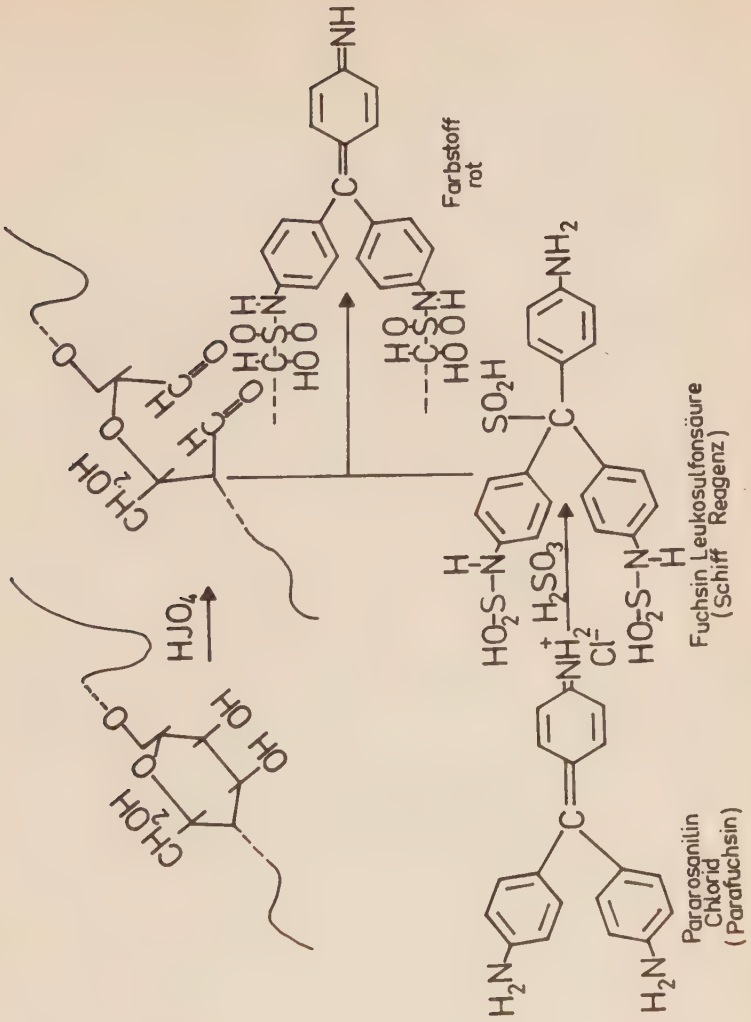

Abb. 14 : Reaktionsschema für die Anfärbung von Glycoproteinen über die jeweiligen Zuruckerreste.

5.2.3 Coating von Kollagen IV an ELISA-Platten aus Polystyrol

Typ IV Kollagen wird in

0,1 M $NaHCo_3$ pH 8,3
0,5 M NaCl
0,o2 % NaN_3

über Nacht mit einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst.[51] Dabei kommt der hohen Ionenstärke die Aufgabe zu, die Kollagenmoleküle in einem entfalteten und nativen Zustand optimal an die Wand der Plattenvertiefung zu binden. Die für die Serumabhängigkeiten vorgelegte optimale Konzentration liegt bei 5 µg/50 µl pro Plattenvertiefung.

5.2.4. Durchführung des ELISA-Tests für die IgG Klasse der anti-Typ IV Kollagen Antikörper

Bei dem durchgeführten indirekten ELISA-Test werden die Kollagenproben als Antigen zunächst unspezifisch an die feste Phase des Polystyrols adsorbiert. Anschließend werden spezifische Antikörper aus dem Serum angebunden, die dann in einem weiteren Reaktionsschritt mit einer immunologischen Indikatorreaktion quantifizierbar sind.
Das experimentelle Vorgehen läßt sich tabellarisch wie folgt zusammenfassen:

Adsorption von 50 µl Typ IV-Kollagen Lsg. pro Loch in

0,1 M Na HCO_3 x Na_2CO_3 Puffer pH 8,3
0,5 M NaCl
0,O2 % NaN_3
Inkubation 12h, 4°C

↓

5 x Waschen in 0,9 % NaCl

↓

Absättigung freier Bindeplätze mit
jeweils 50 µl RSA-Tris pro Loch,
bestehend aus

0,1 M Tris-HCl pH 7,3
2 % RSA
Inkubation 2h, 37°C

↓

Abklatschen der Platte

↓

Testseren mit RSA-Tris verdünnt,
werden in 50 µl Portionen pro Loch
aufgebracht
Inkubation 1h, 37°C

↓

5 x Waschen mit 0,9 % NaCl

↓

50 µl Anti-Human Antikörper, gegen
IgG gerichtet, in RSA-Tris verdünnt
werden pro Loch pipettiert.
Die Antikörper sind dabei mit al-
kalischer Phosphatase konjugiert
und werden mit doppelter Konzentration,
wie vom Hersteller empfohlen, eingesetzt.
Inkubation 2h, 37°C

↓

5 x Waschen mit 0,9 % NaCl

↓

Starten der Indikatorreaktion durch
Zugabe von je 100 µl Substratpuffer.
Das gleichzeitig plattierte positive
Standardserum ist Richtschnur für die
Reaktionsdauer.
In unserem Falle (für die Reihen-

untersuchung) wird bei einer
Standardserumverdünnung von 1/30
nach Erreichen des Extinktions-
wertes von 0,3-A_{405nm}-Einheiten
die Reaktion gestoppt.
Reaktionsdauer ca. 10-15 Min.

↓

Stoppen der Reaktion mit je 10 µl
2 M NaOH

↓

Endgültige Messung der Extinktion
mit dem Mikro-ELISA-Photometer
Microelisa Auto Reader MR 580.

5.2.5 Durchführung des ELISA-Tests für die IgM-Klasse der anti-Typ IV Kollagen Antikörper

Hierbei sind die einzelnen Versuchsabschnitte mit denen für die IgG Klasse gleich, außer der Inkubation mit Anti-human-Antikörpern, die in diesem Falle gegen IgM gerichtet und ebenfalls mit alkalischer Phosphatase konjugiert sind.

5.2.6 Ausführung der durchgeführten Messungen und deren Bewertung

Sämtliche Messungen werden 3-fach parallel ausgeführt. Hieraus wird der Mittelwert zur Grundlage für die graphischen Darstellungen im Ergebnisteil. Meßwerte, die außerhalb des vertretbaren Fehlerintervalls von ± 10 % liegen, werden nicht in die Auswertung gebracht, sondern nochmals wiederholt. Die gemessenen Extinktionswerte stehen als relative Werte für die Typ IV Anti-Kollagen Konzentration und können als absolute Angaben nur durch Testvergleich mit Standardkurven von monoklonalen Antikörpern gegen Typ IV Kollagen erhalten

werden. Die Meßwerte der Seren aus verschiedenen Krankheitsbildern werden statistisch ausgewertet. Dabei wird eine symmetrische Normalverteilung angenommen und der Mittelwert $\bar{x}$ sowie die einfache Standardabweichung σ errechnet.

6. Ergebnis

6.1 Charakterisierung von Typ IV Kollagenen als Antigen durch Gelelektrophorese

Die für den ELISA-Test eingesetzte Typ IV-Kollagenprobe wird mit 2 Typ IV-Kollagenreferenzen und einer Typ I-Kollagenreferenz vom Schwein sowohl in der normalen SDS-Gelelektrophorese als auch in der Gelelektrophorese für Glycoproteine miteinander verglichen.

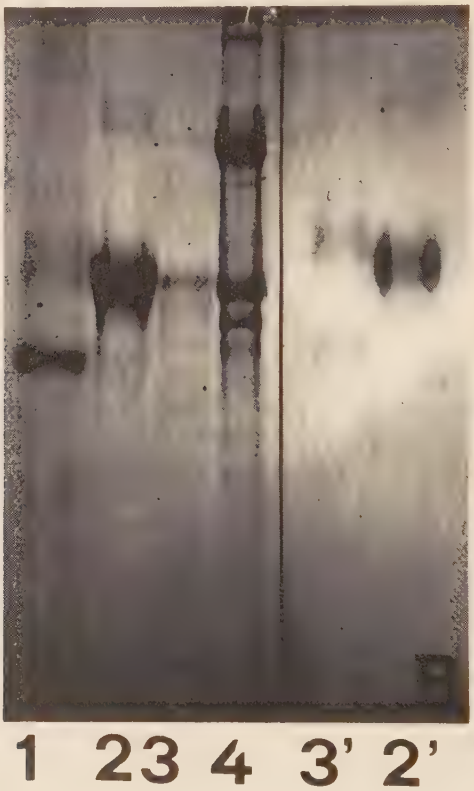

Abb. 15: A SDS-Acrylamid Elektrophorese
1 Human Typ IV Kollagen isoliert von der Arbeitsgruppe Heidemann
2 Human Typ IV Kollagen Firma Sigma
3 Human Typ IV Kollagen isoliert von der Arbeitsgruppe Fietzek
4 Human Typ I Kollagen vom Schwein
B SDS-Acrylamid Elektrophorese mit anschließender Glycoproteinfärbung, Zahlenangabe s. Gruppe A

Dabei ist auffällig, daß das als Antigen eingesetzte Typ IV Kollagen identisch mit dem Typ IV Kollagen von der Arbeitsgruppe Fietzek, München, ist und von dem der Arbeitsgruppe Prof. Heidemann, Darmstadt, abweicht. Exemplarisch ist das Verhalten von Typ I Kollagen; hier zeigt die Glycoproteingelelektrophorese - wie zu erwarten - keine Banden.

6.2 Optimierung des Testsystems in Bezug auf die vorgelegte Antigenkonzentration

Bei der durchgeführten Konzentrationsabhängigkeit von Typ IV Kollagen erreicht das Testsystem bei verschiedenen Serumkonzentrationen mit 5 µg an adsorbierten Typ IV Kollagen einen nicht mehr zu steigernden Meßwert.

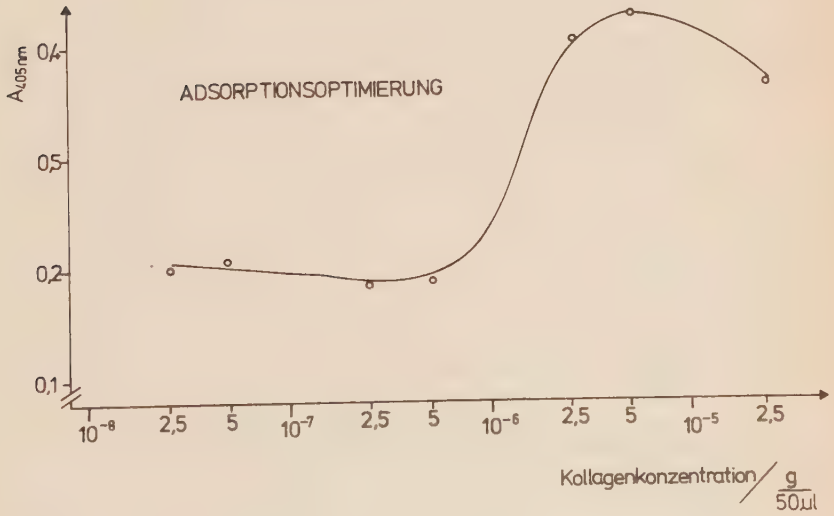

Abb. 16.: Konzentrationsabhängigkeit von Typ IV Kollagen; Auftragung semilogarithmisch mit Serumverdünnung bei 1/30

6.3 Zeitliche und Temperatur abhängige Optimierung der Typ IV Kollagen Adsorption an Polystyrol

Die unspezifische Bindung von Typ IV Kollagen ist ein Temperatur abhängiger Prozeß und bedarf daher der Optimierung. Ausgeführt werden die Inkubationen lediglich bei 4°C, 12h und bei 37°C, 2h, als Überprüfung von bereits beschriebenen Inkubationswerten.

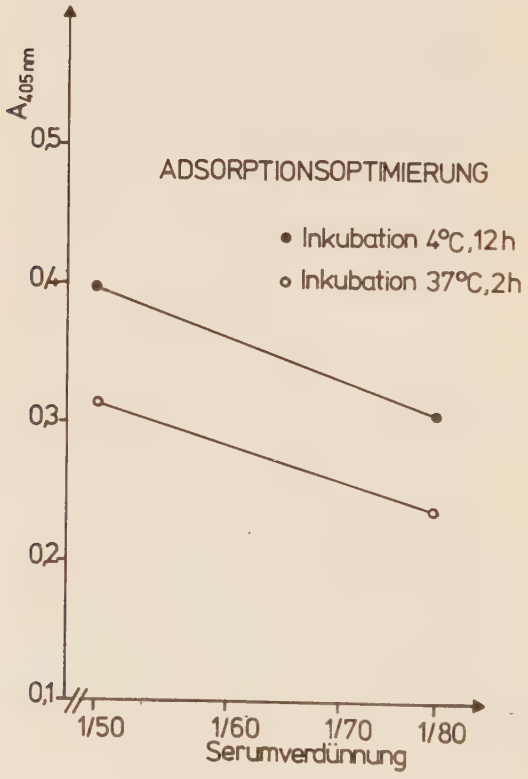

Abb. 17: Temperatur und Zeitoptimierung bei einer Serumverdünung von 1/30, Auftragung halblogarithmisch

Dabei können signifikant höhere Extinktionswerte bei 4°C,12h für das Standardserum festgestellt werden. Eine weitergehende Optimierung wurde nicht mehr durchgeführt.

6.4 Spezifitätstest des vorgestellten ELISA-Testsystems

Der Nachweis auf spezifische Anti-Typ IV Kollagen Bindung an das vorliegende Antigen wird als indirekter Test durchgeführt.
Dabei wird eine definierte Menge von 0,4 mg Typ IV Kollagen zu den bereitgestellten Serumverdünnungen gegeben und bei 37°C, 1h, in einem Gesamtvolumen von 2 ml inkubiert. Entstandenes Immunpräzipitat wird anschließend 30 Minuten bei 15.000 rpm herunterzentrifugiert. Das so vorbehandelte Serum wird - ebenso wie das gleichbehandelte - nicht mit Typ IV Kollagen vorinkubierte Serum in den ELISA-Test eingesetzt.

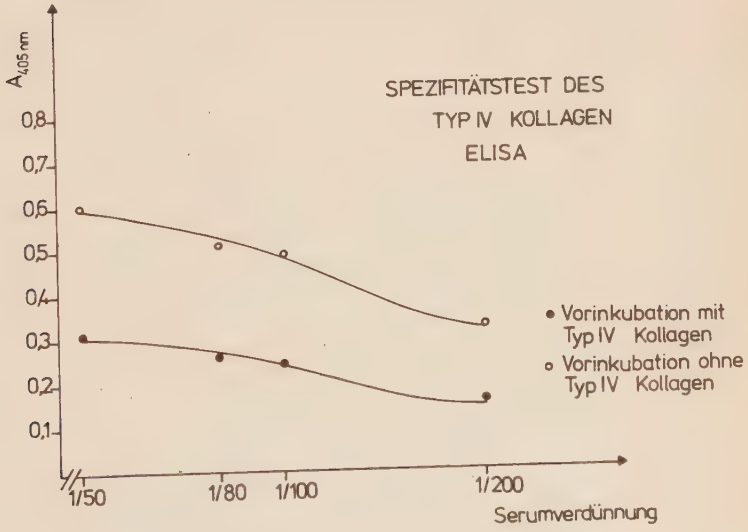

Abb. 18: Spezifitätstest bei verschiedenen Serumverdünnungen mit und ohne Vorinkubation mit Typ IV Kollagen; Auftragung semilogarithmisch

6.5 Darstellung einer Bindekurve für ein positives und negatives Standardserum, unter optimalen Versuchsbedingungen; IgG und IgM Klassen spezifisch

Die Standardkurve gibt einen relativ guten Einblick in die Konzentrationsverhältnisse der untersuchten Antikörper von Patientenseren und ist ein notwendiger Orientierungsrahmen für die Reproduzierbarkeit von Meßwerten.

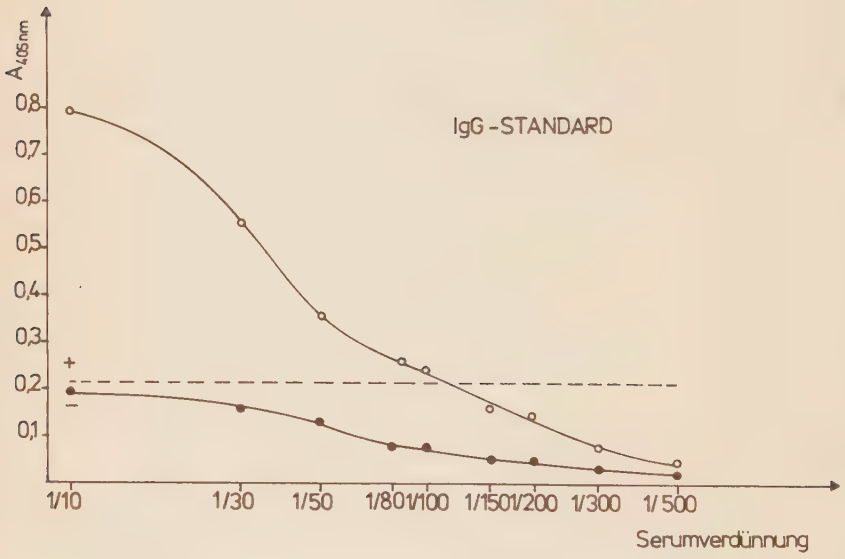

Abb. 19: Standardkurve für IgG Klasse gegen Typ IV Kollagen bei unterschiedlichen Serumverdünnungen; Auftragung semilogarithmisch

Die mit o gekennzeichnete Kurve repräsentiert eine positive Standardkurve, die mit • gekennzeichnete Kurve ist eine negative Standardkurve. Die gestrichelte Linie stellt die Schwellenlinie für positiv zu wertende Meßwerte dar und beträgt 0,214 $A_{405\ nm}$

Im Falle der IgM Antikörper-Klasse stellt sich die Standardkurve wie folgt dar:

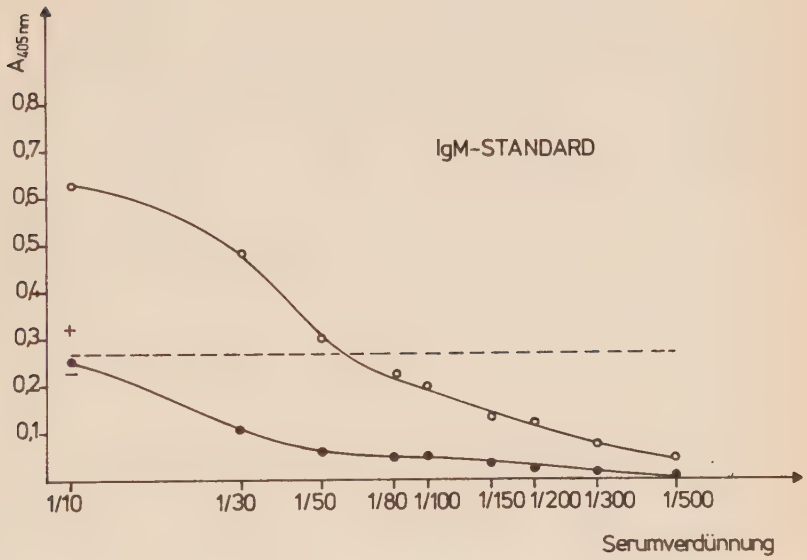

Abb. 20: Standardkurve für IgM Klasse gegen Typ IV Kollagen bei unterschiedlichen Serumverdünnungen; **Auftragung semilogarithmisch**

Die mit o gekennzeichnete Kurve repräsentiert eine positive Standardkurve, die mit • gekennzeichnete Kurve ist eine negative Standardkurve. Die gestrichelte Linie stellt die Schwellenlinie für positiv zu wertende Meßwerte dar und beträgt $0{,}260_{A\ 405\ nm}$

Es fällt dabei auf, daß niedrige Serum-Verdünnungsstufen für den Erhalt eines meßbaren positiven Signals notwendig sind. Die Standardkurve ist, wie bereits erwähnt, Anhaltspunkt für die Reproduzierbarkeit des ELISA-Testsystems. Es dürfen sich die zu unterschiedlichen Zeiten durchgeführten Standardkurven nur im üblichen Fehlerrahmen von $\pm$ 10 % bewegen.

6.6 Durchführung der Titerbestimmung für anti-Typ IV Kollagen Antikörper der Klasse IgG und Ig^M bei unterschiedlichen Krankheitsbildern

Die Messungen werden bei einer Serumverdünnung von 1/30 durchgeführt, da die Standardkurve bei dieser Verdünnung einen eindeutig positiven Meßwert liefert. Untersucht werden Patientenseren mit folgenden Krankheitsbildern:

Art der Erkrankung	Patienten Anzahl	Abkürzung
1. Normalkollektiv	22	N
2. LE	35	L
3. Degenerative Gelenkerkrankungen	6	D
4. Psoriasis (Arthritis psoriatica)	6	AP
5. M. Bechterew (Spondylitis ankylopoetica)	5	SA
6. M. Reiter	2	RS
7. CP (chron. Polyarthritis)	14	CP
8. Unspezifische Kollagenosen (im Sinne von Dermatomyositis und progressiver Systemsklerose)	25	K
9. Oligoarthritis	5	OA
10. Verschiedene (ausgenommen die bereits aufgeführten)	7	V

Tab. 5: Auflistung der untersuchten Seren nach Krankheitsbildern

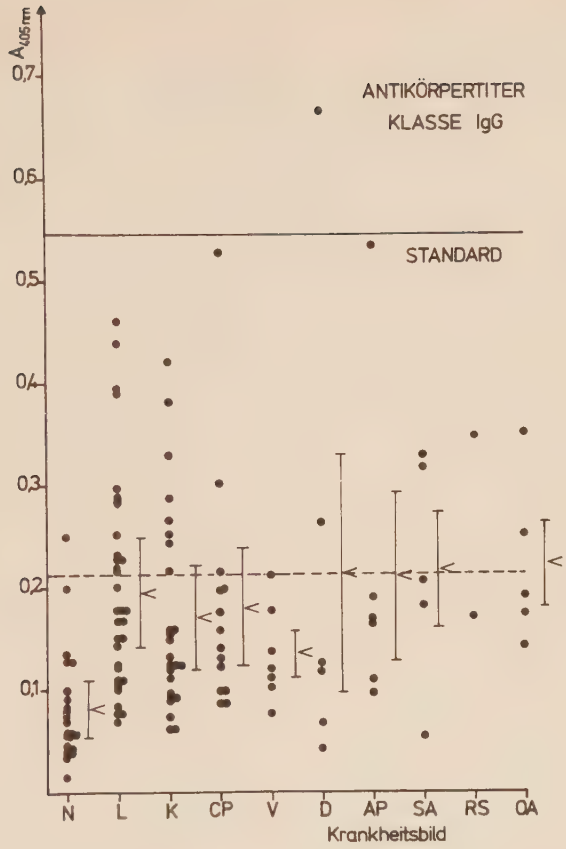

Abb. 21: Anti-Typ IV Kollagentiter der IgG-Klasse bei verschiedenen Krankheitsbildern; gestrichelte Linie entspricht der als positiv gewerteten Bewertungsschwelle ; Abkürzungen siehe Tab. 5

Die Anti-Typ IV Kollagenbestimmung wird nicht ausschließlich für die IgG-Klasse, sondern auch für die IgM-Klasse durchgeführt.

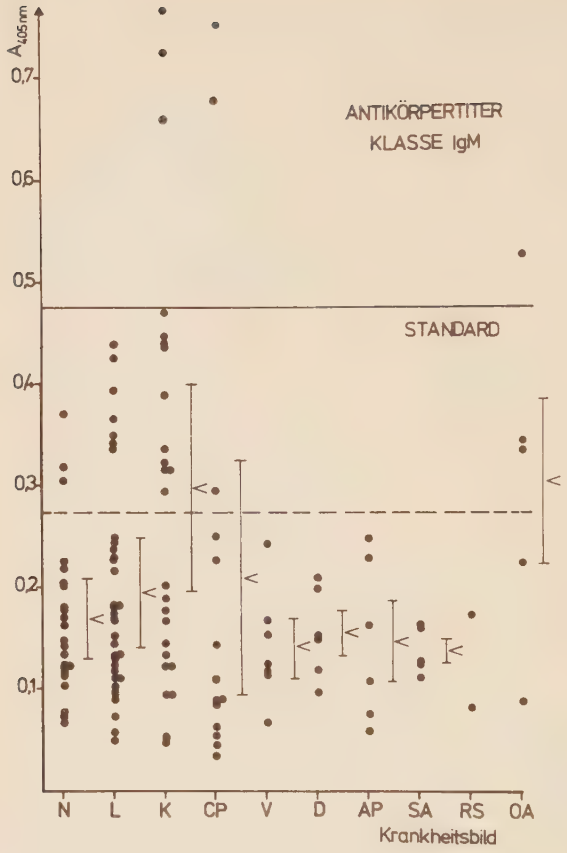

Abb. 22 : Anti-Typ IV Kollagentiter der IgM-Klasse bei verschiedenen Krankheitsbildern; gestrichelte Linie entspricht der als positiv gewerteten Bewertungsschwelle; Abkürzungen siehe Tab. 5

Zur besseren Charakterisierung der gewonnenen Ergebnisse aus beiden Messungen errechnen wir den Quotienten aus IgG und IgM für alle positiven IgG Bestimmungen. Umgekehrt errechnen wir den Quotienten aus IgM und IgG für alle positiven IgM Bestimmungen.

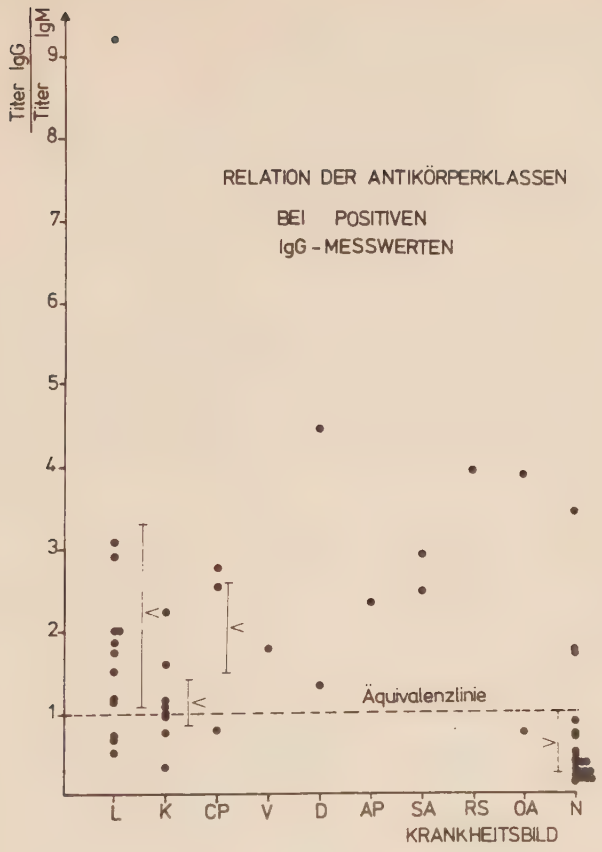

Abb. 23 : Quotientenbildung aus dem erhaltenen IgG und IgM Titer aller positiven Meßwerte für die anti Typ IV Kollagen Antikörper der IgG Klasse bei den aufgeführten Krankheitsbildern.

Abkürzungen siehe Tab. 5

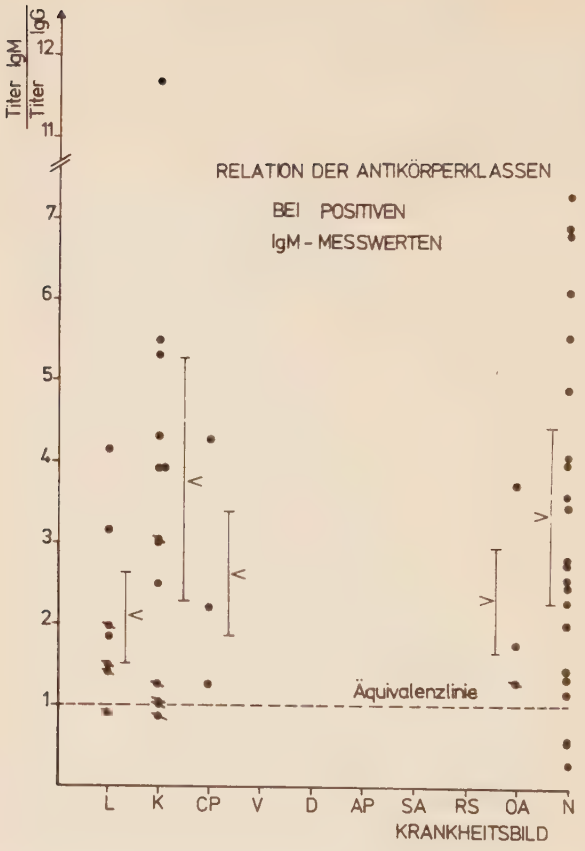

Abb. 24: Quotientenbildung aus dem erhaltenen IgM und IgG Titer aller positiven Meßwerte für die anti Typ IV Kollagen Antikörper der Klasse IgM bei den aufgeführten Krankheitsbildern. Die mit Ø versehenen Meßpunkte sind auch bei der Auftragung für den IgG/IgM Quotienten aufgeführt.

Abkürzungen siehe Tab. 5

Zur Verdeutlichung der so verarbeiteten Meßwerte für jeden einzelnen positiven Meßpunkt wird sowohl der IgG als auch der zugehörige IgM Titer parallel in Form einer Tabelle und als graphische Darstellung, nach untersuchten Kollektiven getrennt, aufgeführt.

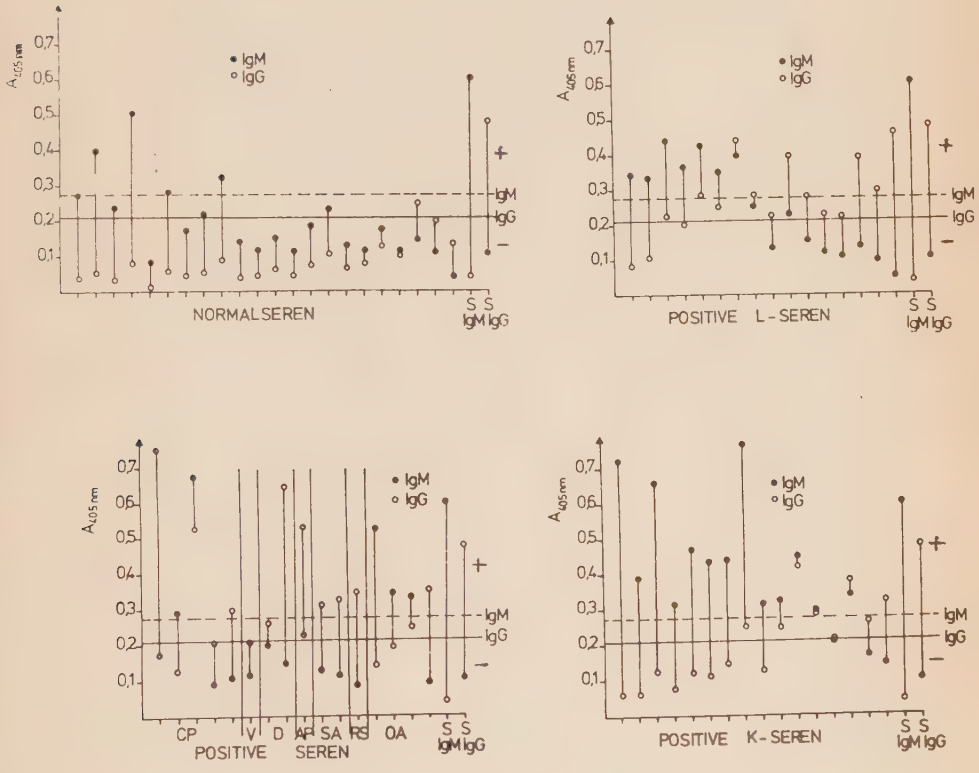

Abb. 25: Zusammenfassende graphische Darstellung der gewonnenen positiven IgG und IgM Werte, nach Krankheitsbildern geordnet; die Bezeichnung "S" gilt für die Standardmeßwerte.

——— Schwellenwertlinie für positive IgG-Meßwerte

---- Schwellenwertlinie für positive IgM-Meßwerte

Abkürzungen siehe Tab. 5

Seren	IgG Titer (A_{405nm})	IgM Titer (A_{405nm})	Titer IgG/ Titer IgM
N			
1	0,038	0,277	0,137
2	0,058	0,401	0,145
3	0,035	0,238	0,147
4	0,083	0,507	0,164
5	0,015	0,087	0,172
6	0,058	0,286	0,203
7	0,043	0,176	0,244
8	0,056	0,221	0,253
9	0,091	0,324	0,280
10	0,042	0,144	0,292
11	0,043	0,120	0,358
12	0,064	0,174	0,368
13	0,046	0,117	0,393
14	0,076	0,191	0,398
15	0,104	0,235	0,443
16	0,066	0,131	0,500
17	0,079	0,114	0,690
18	0,127	0,175	0,726
19	0,098	0,113	0,867
20	0,249	0,147	1,694
21	0,198	0,110	1,800
22	0,134	0,039	3,440
Gesamt 22			
LE			
1	0,083	0,343	0,242
2	0,107	0,337	0,32
3	0,226	0,440	0,51
4	0,200	0,367	0,54
5	0,285	0,425	0,67
6	0,250	0,350	0,71
7	0,439	0,395	1,11
8	0,287	0,250	1,15
9	0,225	0,131	1,72

Seren	IgG Titer (A_{405nm})	IgM Titer (A_{405nm})	Titer IgG/ Titer IgM
LE			
10	0,397	0,228	1,74
11	0,282	0,153	1,84
12	0,232	0,118	1,97
13	0,220	0,111	1,98
14	0,390	0,135	2,89
15	0,295	0,096	3,07
16	0,460	0,050	9,20
Gesamt 35			
K			
1	0,062	0,725	0,086
2	0,060	0,391	0,153
3	0,124	0,661	0,188
4	0,072	0,316	0,231
5	0,119	0,472	0,252
6	0,111	0,437	0,254
7	0,251	0,769	0,327
8	0,147	0,442	0,332
9	0,124	0,317	0,39
10	0,243	0,324	0,75
11	0,421	0,449	0,94
12	0,287	0,296	0,97
13	0,216	0,203	1,06
14	0,382	0,338	1,13
15	0,265	0,168	1,58
16	0,323	0,146	2,21
Gesamt 25			
CP			
1	0,175	0,753	0,232
2	0,296	0,130	0,439
3	0,528	0,679	0,78
4	0,214	0,085	2,52
5	0,302	0,110	2,75
Gesamt 14			

Seren	IgG Titer (A_{405nm})	IgM Titer (A_{405nm})	Titer IgG/ Titer IgM
D			
1	0,264	0,20	1,32
2	0,665	0,149	4,46
Gesamt 6			
V			
1	0,214	0,119	1,8
Gesamt 7			
AP			
1	0,536	0,23	2,33
Gesamt 6			
SA			
1	0,317	0,129	2,46
2	0,330	0,113	2,92
Gesamt 5			
RS			
1	0,348	0,088	3,95
Gesamt 2			
OA			
1	0,141	0,528	0,267
2	0,192	0,346	0,556
3	0,251	0,337	0,750
4	0,351	0,090	3,9
Gesamt 5			

Tab. 6: Auflistung aller für IgG und IgM positiven Meßwerte oberhalb der jeweiligen Schwellenwerte (Schwellenwert IgG = 0,214 $A_{405\ nm}$ und IgM = 0,25 $A_{405\ nm}$) nach Krankheitsbildern geordnet.

Abkürzungen siehe Tab. 5

7. Diskussion

Betrachtet man die erhaltenen Meßwerte für die IgG- und IgM-Untersuchungen getrennt, so zeigen fast alle untersuchten Krankheitsbilder im Falle der IgG-Messungen gegenüber den Normalseren einen durchschnittlich erhöhten anti-Typ IV Kollagen-Titer.
Die IgM-Bestimmungen ergeben hierbei ein wesentlich heterogeneres Bild im Vergleich zu den respektiven Normalseren. Es werden sowohl Meßwerte mit normalen anti-Typ IV Kollagen Titerwerten als auch einige mit sehr hohen festgestellt. Dabei kann hieraus kein eindeutiger Trend im Vergleich zu den Normalseren gefunden werden. Die Normalserumpopulation ist relativ einheitlich und zeigt für die IgG-Bestimmung nur einen Meßwert, der geringfügig über der Schwellenlinie zum positiven Meßbereich liegt.
Anders hingegen im Falle der IgM-Messung; hier sind es 3 Meßpunkte.
Zum besseren Bewerten der Meßwerte wird von einer symmetrischen Verteilung der Meßpunkte ausgegangen, und es wird eine Schwerpunktbestimmung mit Ermittlung der zugehörigen Standardabweichungen durchgeführt. Die gewonnenen Werte bestätigen den Trend von erhöhtem IgG- und IgM-Titer bei Erkrankungen des Bindegewebes. Im Falle der IgG-Bestimmungen zeigen die Standardabweichungen der untersuchten Patientengruppen, bis auf die der degenerativen Gelenkerkrankungen, keine Überschneidung mit der des Normalkollektivs. Eine mathematisch sinnvolle Interpretation ist anhand der untersuchten Proben nur für die unspezifischen Kollagenosen, die chronische Polyarthritis und den LE zu treffen. Bei der IgM-Antikörperklasse besteht bis auf die Gruppe der Patienten mit Oligoarthritis eine signifikante Überlappung der Standardabweichung mit der aus dem Normalkollektiv. Dieses heterogene Bild zeigt eine größere Streuung der aufgeführten Meßwerte und bedeutet somit eine geringere Spezifität für das Testsystem. Grund hierfür könnte ein unterschiedliches Krankheitsstadium sein, da - wie bekannt - Immunreaktionen einer Dynamik der Antikörperklassen in Abhängigkeit vom Erkrankungsbeginn unterliegen [97]. So wurde bereits in den 60er Jahren beschrieben, daß nach

Immunisierung von Kaninchen mit Diphtherie Toxoid ein phasenförmiger Antikörperverlauf auftritt. Etwa 5 Tage nach Injektion antworten die Tiere mit einem Anstieg der IgM-Produktion, die um den 10. Tag ihr Maximum erreicht. Ab dem 13. Tag nach erfolgter Injektion schleicht sich die IgG-Antwort bei abklingender IgM-Synthese ein. Das Maximum der IgG-Produktion wird etwa mit dem 21. Tag post injectionem erreicht.
In ähnlicher Weise stellt sich der Immunkörperverlauf von Hepatitis B - und A - beim Menschen dar. Auch hier eilt im Falle der Hepatitis B der Anti-HB_C (IgM) Titer zunächst dem später ansteigenden Anti-HB_C (IgG) Titer voraus [98].
Dem hohen IgM Titer kommt bei den Infektionskrankheiten somit eine Indikatorfunktion im Frühstadium zu. Überträgt man diese Erkenntnis auf die Erkrankungen des Bindegewebes mit der hypothetischen Annahme eines bisher nicht näher charakterisierbaren Infektionsagens, so wäre die durchgeführte IgM Titerbestimmung ein auf den Verlauf hinweisender Parameter und die IgG Konzentration gegen Typ IV Kollagen dagegen ein beständigerer Hinweis auf einen chronischen Prozeß des Bindegewebes.
Faßt man die gemessenen Werte für IgG oberhalb der Schwellenlinie als Quotient mit den zugehörigen IgM-Werten (IgG/IgM) bei verschiedenen Krankheitsbildern zusammen, so wird das Gesamtbild für den Lupus erythematosus, die unspezifischen Kollagenosen und das der chronischen Polyarthritis klarer. Die Schwerpunkte dieser gebildeten Quotienten liegen durchweg über einer als Äquivalenzlinie bezeichneten Linie, für die der IgG/IgM-Wert 1 ist. Die Normalseren liegen dabei mit ihrem Schwerpunkt unterhalb dieser Linie. Vergleicht man die IgG Meßpunkte von Patientenseren, die oberhalb des festgelegten Schwellenwertes liegen mit denen des Normalkollektivs, so ergibt sich bei gleichzeitiger Gegenüberstellung der Meßwerte mit einem IgG/IgM Quotienten größer oder gleich 1 folgende prozentuale Verteilung für die 3 am besten untersuchten rheumatischen Krankheitsbilder.

Krankheitsbild	N	LE	K	CP
Gesamtzahl der durchgeführten Untersuchungen/Krankheitsbild	22	35	25	14
Anzahl der Meßwerte oberhalb des Schwellenwertes für IgG	1	13	8	4
Anteil an Meßwerten oberhalb des Schwellenwertes für IgG (%)	4,5	37	32	29
Anzahl der Meßwerte oberhalb des Schwellenwertes für IgG bei gleichzeitigem Quotienten IgG/IgM $\geq$ 1	1	10	4	2
Anteil der über dem Schwellenwert liegenden Meßwerte bei gleichzeitigem Quotienten IgG/IgM $\geq$ 1 (%)	4,5	29	16	14

N = Normalkollektiv
LE = Lupus erythematosus
K = unspezifische Kollagenosen
CP = chronische Polyarthritis

Tab. 7: Übersicht über die Anti Typ IV Kollagen Titer-Verteilung bei den drei am besten untersuchten rheumatischen Krankheitsbildern im Vergleich zum Normalkollektiv

Trägt man für alle gemessenen positiven Anti Typ IV Kollagen-Werte der IgM-Klasse die zugehörigen IgM/IgG-Quotienten von den beschriebenen Krankheitsbildern auf, so läßt sich hier das Bild aufgrund der Heterogenität nicht interpretieren. Auch die Normalseren weisen bei dieser Auftragung eine breite Streuung auf.
Insgesamt kann anhand der bisher diskutierten Meßwerte eine deutliche Aktivität von Anti-Typ IV Kollagen der IgG-Klasse bei Patienten mit Kollagenosen festgestellt werden.

Die aufgezeigten Ergebnisse bedürfen jedoch zur näheren Charakterisierung und stärkeren Absicherung noch einer verlaufsmäßigen Beobachtung der gemessenen Parameter. Dabei wären die starken IgM-Titerschwankungen sicherlich durch den Verlauf erklärbar und bei Messungen in einer bestimmten standardisierten Erkrankungsphase könnten hohe und eindeutige Messungen erhalten werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß für das Ausmaß einer rheumatischen Erkrankung der Anti-Typ IV Kollagenantikörper der Klasse IgG eine Rolle spielt. Leider ist dies vorerst statistisch relevant für den Lupus erythematosus, die unspezifischen Kollagenosen und die chronische Polyarthritis aufgezeigt.

8. Literatur

1) Klemperer, P.: The concept of collagen-disease (1950), Amer.J.Pathol. 26, 505

2) Rodnan, G.P., Currier, Mc. Ewen, M.D., Stanley, L. and Wallace, M.D.: Primer on the rheumatic diseases (1973), J.Amer.Med.Ass. 224, 661-812

3) Tan, E.M., Schur, P.H., Carr, R.T., Kunkel, H.G.: Deoxyribonucleic acid (DNA) and andibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus (1966), J.Clin.Invest. 45, 1732-1740

4) Lafer, E.M., Möller, A., Nordheim, A., Stollar, B.D. an Rich, A.: Antibodies specific for left-handed Z-DNA (1981), Proc.Natl.,Acad.Sci. USA 78, 3546-3550

5) Lerner, M.R., Boyle, J.A., Harin, J.A., Steitz, J.A.: Two novel classes of small ribonucleoproteins detected by antibodies associated with lupus erythematosus (1981), Science 211, 400-402

6) Lerner, E.A., Lerner, M.R., Harin, J.A., Janeway, J.R.C.A. and Steitz, J.A.: Deciphering the mysteries of RNA-containing lupus antigens (1982), Arthritis Rheum. 25, 761-766

7) Alarcon-Segovia, D., Fishbein, E., Alacala, H., Olguin-Palacios, E., Estrada-Parra, S.: The range and specificity of antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus (1970), Clin.Exp.Immunol. 6, 557-571

8) Koffler, D., Schur, P.H., Kunkel, H.G.: Immunological Studies concerning the nephritis of systemic lupus erythematosus (1967), J.Exp.Med. 126, 607-624

9) Koffler, D., Carr, R., Agnello, V., Thoburn, R. and Kunkel, H.G.: Antibodies to polynucleotides in human sera: antigenic specificity and relation to disease (1971), J.Exp.Med. 134, 294-312

10) Taylor, R.P., Weber, D., Broccoli, A.V., Winfield, J.B.: Stability of DNA/ anti-DNA complexes (1979), J. Immunol. 122, 115-120

11) Izui, S., Lambert, P.H. and Miescher, P.A.: In vitro demonstration of a particular affinity of glomerular basement membrane and collagen for DNA (1976), J.Exp.Med. 144, 428-443

12) Asano, Y., Nakamoto, Y.: Avidity of antibody and glomerular immune complex localization in lupus nephritis (1978), Clin.Nephrol. 10, 134-139

13) Tan, E.M.: Special antibodies for the study of systemic lupus erythematosus (1982), Arthritis Rheum. 25, 753-756

14) MacGillivray, A.J., Carroll, A.R., Dahi, S., Naxakis, G., Sadaie, M.R., Wallis, C.M. and Jing, T.: The composition of the nuclear antigens Sm and RNP of human rheumatic and connective tissue diseases and the relevance of their autoantibodies as probes for RNA processing mechanisms (1982), FEBS Letters 141, 139-147

15) Lerner, M.R., Steitz, J.A.: Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus (1979), Proc.Natl.Acad.Sci. USA 76, 5495-5499

16) Lenk, R.P., Maizel, J.V. and Crouch, R.J.: Expression of two late adenovirus genes is altered by introducing antibodies against ribonucleoprotein into living Hela cells (1982), Eur.J.Biochem. 121, 475-482

17) Takano, M., Agris, P.F. and Sharp, G.C.: Purification and biochemical characterization of nuclear ribonucleoprotein antigen using purified antibody from serum of a patient with mixed connective tissue disease (1980), J.Clin.Invest. 65, 1449-1456

18) Takano, M., Golden, S.S., Sharp, G.C. and Agris, P.F.: Molecular relationships between two nuclear antigens ribonucleoprotein and Sm: Purification of active antigens and their biochemical characterization (1981), Biochemistry 20, 5929-5936

19) Barque, J.P., Veni, P., Peraudeau, L., Danon, F. and Larsen, C.J.: Nuclear ribonucleoproteins recognized by human antinuclear antibodies in retrovirus-infected cells (1981), Biochem.Biophys.Res.Commun. 99, 284-291

20) Lerner, E.A., Lerner, M.R., Janeway, J.R.C.A. and Steitz, J.A.: Monoklonal antibodies to nucleic acid containing cellular constituents: Probes for Molecular biology and autoimmune disease (1981), Proc. Natl.Acad.Sci. USA 78, 2737-2741

21) Lerner, M.R., Boyle, J.A., Mount, S.M., Wolin, S.L. and Steitz, J.A.: Are snRNP's involved in splicing? (1980) Nature 283, 220-224

22) Busch, H., Reddy, R., Henning, D., Epstein, P.: Structure of the U-snRNAs (1980), Cell Biology Heidelberg, Springer, 47-52

23) Rogers, J. and Wall, R.: A mechanism for RNA splicing (1980), Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77, 1877-1879

24) Yang, V.W., Lerner, M.R., Steitz, S.A. and Flint, S.J.: A small ribonucleoprotein is required for splicing of adenoviral early RNA sequences (1981), Proc.Natl.Acad.Sci. USA 78, 1371-1375

25) Lerner, M.R., Andrews, N.C., Miller, G. and Steitz, J.A.: Two small RNA's encoded by Epstein-Barr virus and complexed with protein are precipated by antibodies from patients with systemic lupus erythematosus (1981), Proc.Natl.Acad.Sci. USA 78, 805-809

26) Clark, G.M., Reichlin, M. and Tomasi, T.B.: Characterization of a soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythematosus (1968), J.Immunol. 102, 117-122

27) Mattioli, M. and Reichlin, M.: Heterogeneity of RNA protein antigens reactive with sera of patients with systemic lupus erythematosus (1974), Arthritis Rheum. 17, 421-429

28) Depper, J.M. and Zvaifler, N.J.: Current comment: Epstein-Barr virus - It's relationship to the pathogenesis of rheumatoid arthritis (1981), Arthritis Rheum. 24, 755-761

29) Pincus, T.: Studies regarding a possible function for viruses in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (1982), Arthritis Rheum. 25, 847 - 856

30) Slaughter, L., Carson, D.A., Jensen, F.C., Holbrook, T.L. and Vanghan, J.H.: In vitro effects of Epstein-Barr virus in peripheral blood mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis and normal subjects (1978), J.Exp.Med. 148, 1429-1434

31) Stollar, B.D.: Varying specificity of systemic lupus erythematosus sera for histone fractions and a periodate-sensitive antigen associated with histone (1969), J.Immunol. 103, 804-808

32) Tan, E.M. Robinson, J. and Robitaille, P.: Studies on antibodies to histones by immunofluorescence (1979), Scand.J.Immunol. 5, 811-818

33) Rubin, R.L., Joslin, F.G. and Tan, E.M.: A solid phase radioimmunoassay for anti-histone antibodies in human sera: comparison with a immunofluorescence assay (1982), Scand.J.Immunol. 15, 63-70

34) Rubin, R.L., Joslin, F.G. and Tan, E.M.: Specificity of anti-histone antibodies in systemic lupus erythematosus (1982), Arthritis Rheum. 25, 779-782

35) Kunkel, H.G., Müller-Eberhard, H.G., Fudenberg, H.H., Tomasi, T.B.: Gamma-globulin complexes in rheumatoid arthritis and certain other conditions (1961), J.Clin.Invest. 40, 117-129

36) Winchester, R.J., Kunkel, H.G. and Agnello, V.: Occurrence of globulin complexes in serum and joint fluid of rheumatoid arthritis patients. Use of monoclonal rheumatoid arthritis patients. Use of

monoclonal rheumatoid factors as reagents for their demonstration (1971), J.exp.Med. 134, 286-295

37) Metzger, H.: Structure and function of γM macroglobulins (1970), Adv.Immun. 12, 57-116

38) Steffen, C. and Timpl, R.: Antigenicity of collagen and its application in the serological investigation of rheumatoid arthritis sera (1963), Int. Archs.Allergy appl. Immun. 22, 333-349

39) Roberts-Thomson, P.J., Hazleman, B.L., Barnett, I.G., MacLennan, I.C.M. and Mowat, A.G.: Factors relating to circulating immune complexes in rheumatoid arthritis (1976), Ann.rheum.Dis. 35, 314-320

40) Madri, J.A. and Furthmayr, H.: Isolation and tissue localization of type AB_2 collagen from normal lung parenchyma (1979), Am.J.Pathol. 94, 323-330

41) Odermatt, E., Risteli, J., van Delden, V. and Timpl, R.: Structural diversity and domain composition of a unique collagenous fragment (intima collagen) obtained from human placenta (1983), Biochem.J. 211, 295-302

42) Timpl, R., Wiedemann, H., van Delden, V., Furthmayr, H. and Kühn, K.: A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes (1981), Eur.J.Biochem. 120, 203-211

43) Kühn, K., Wiedemann, H., Timpl, R., Risteli, J., Dieringer, H., Voß, T. and Glanville, R.W.: Macromolecular structure of basement membrane collagens Identification of 7S collagen as a crosslinking domain of type IV collagen (1981), FEBS Lett. 125, 123-128

44) Sakai, L.Y., Engvall, E., Hollister, D.W. and Burgeson, R.E.: Production and characterization of a monoclonal antibody to human type IV collagen (1982), Am.J.Pathol. 108, 310-318

45) Schwartz, D., Chin-Quee, T. and Veis, A.: Characterization of bovine anterior-lens-capsule basement-membrane collagen, 1. Pepsin susceptibility, salt precipitation and thermal gelation: a property of Non-collagen Component integrity (1980), Eur.J. Biochem. 103, 21-27

46) Trüeb, B., Gröbli, B., Spiess, M., Odermatt, B.F. and Winterhalter, K.H.: Basement membrane (Type IV) collagen is a heteropolymer (1982), J.Biol.Chem. 257, 5239-5345

47) Dieringer, H.: Untersuchungen zur molekularen und makromolekularen Struktur von Typ IV Kollagen aus menschlicher Plazenta (1982), Dissertation

48) Sage, H., Woodbury, R.G. and Bornstein, P.: Structural studies on human Type IV collagen (1979), J.Biol.Chem. 254, 9893-9900

49) Timpl, R., Risteli, J. and Bächinger, H.P.: Identification of a new basement membrane collagen by the aid of large fragment resistant to bacterial collagenase (1979), FEBS Lett. 101, 265-268

50) Andriopoulos, N.A., Mestecky, J., Miller, E.J. and Bennett, J.C.: Antibodies to native and denatured collagens in Synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis (1976), Clin.Immunol. Immunopathol. 6, 209-212

51) Mackel, A.M., DeLustro, F., Harper, F.E. and Carwile LeRoy, E.: Antibodies to collagen in scleroderma (1982), Arthritis and Rheum. 25, 522-531

52) Stuart, J.M., Townes, A.S. and Kang, A.H.: The role of collagen autoimmunity in animal models and human diseases (1982), J.Invest.Dermatol. 79, 121-127

53) Stuart, J.M., Cremer, M.A., Townes, A.S. and Kang, A.H.: Type II collagen - induced arthritis in rats (1982), J.Exp.Med. 155, 1-16

54) Yaar, M., Foidart, J.M., Brown, K.S., Rennard, S.I., Martin, G.R., Liotta, L.: The goddpasture- linke syndrome in mice induced by intravenous injections of anti-type IV collagen and anti-laminin antibody (1982), Am.J.Pathol. 107, 79-90

55) Courtenay, J.S., Dallman, M.J., Dayan, A.D., Martin, A. and Mosedale, B.: Immunization against heterologous type II collagen induces arthritis in mice (1980), Nature 283, 666-668

56) Stuart, J.M., Huffstutter, E.H., Townes, A.S. and Kang, A.H.: Incidence and specificity of antibodies to types I, II, III, IV and V collagen in rheumatoid arthritis and other rheumatic diseases as measured by ^{125}I - radioimmunoassay (1983), Arthritis and Rheum. 26, 832-840

57) Leder, P.: The genetics of antibody diversity (1982), Scientific American 3 , 72-83

58) Zinkernagel, R.M., Callahan, G.N., Klein, J., Dennert, G.: Cytotoxic T cells learn specificity for self H-2 during differentiation in the thymus (1978), Nature 271, 251-253

59) Cayre, Y., Palladino, M.A., Marcu, K.B. and Stavnezer, J.: Expression of an antigen receptor on T-cells does not require recombination at the immunoglobulin J_H-Cu lucus (1981), Proc.Natl.Acad. Sci. USA 78, 3814-3818

60) Langman, R.E.: The role of the major histocompatibility complex in immunity: A new concept in the functioning of a cell-mediated immune system (1978), Rev.Physiol.Biochem.Pharmacol. 81, 1-35

61) Zinkernagel, R.M. and Doherty, P.C.: MHC-restricted cytotoxic T cells: Studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigen determining T cell restriction. Specifity, function and responsiveness (1979), Adv. Immunol. 27, 51-177

62) Wekerle, H. and Ketelsen, V.P.: Thymic nurse - Ia - bearing epithelium involved in T-Lymphocyte differentiation (1980), Nature 283, 402-404

63) Bevan, M.J.: Thymic education (1981), Immunology Today 2, 216-219

64) Bevan, M.J. and Fink, P.J.: The influence of thymus H-2 antigens on the specificity of maturing killer and helper cells (1978), Immunol.Rev. 42, 4-19

65) Katz, D.H.: Lymphocyte Differentiation, Recognition and Regulation (1977) Academic Press, New York

66) Teale, J.M., Layton, J.E. and Nossal, G.J.V.: In vitro model for natural tolerance to self-antigens: Inhibition of the development of surface immunoglobulin-negative lymphocytes into T-independent responsive B cells by antigen (1979), J.Exp.Med. 150, 205-217

67) Biggazzi, P.E., Kosuda, L.L., Hsu, K.C. and Andres, G.A.: Immune complex orchitis in vasectomized rabbits (1976), J.Exp.Med. 143, 382-404

68) Breshnihan, B. and Jasin, H.E.: Suppressor function of peripheral blood mononuclear cells in normal individuals and in patients with systemic lupus erythematosus (1977), J.Clin.Invest. 59, 106-113

69) Abdou, N.I., Sagawa, A., Pascual, E. Herbert, J., Sadeghee, S.: Suppressor T cell abnormality in idiopathic systemic lupus erythematosus (1976), Clin.Immunol.Immunopathol. 6, 192-199

70) Sagawa, A. and Abdou, N.I.: Suppressor-cell dysfunction in systemic lupus erythematosus: Cells involved and in vitro correction (1978), J.Clin. Invest. 62, 789-796

71) Fauci, A.S., Steinberg, A.D., Haynes, B.F. and Whaley, G.: Immunoregulatory aberrations in systemic lupus erythematosus (1978), J.Immunol. 121, 1473-1479

72) Sakane, T., Steinberg, A.D. and Green, I.: Failure of autologous mixed lymphocyte reactions between T and non-T cells in patients with systemic lupus erythematosus (1978), Proc.Natl.Acad.Sci. USA 75, 3464-3468

72a) Okada, J. and Stastny, P.: Antibodies against T-cells, B-cells and monocytes in patients with SLE (1981), Arthritis Rheum. (Abstr.) 24, 76

73) Veen, J.P.W., van der, and Rolink, A.G., and Gleichmann, E.: Diseases caused by reactions of T lymphocytes to incompatibile structures of the major histocompatibility complex: III. Autoantibodies to thymocytes (1981), J. Immunol. 127, 1281-1286

74) Theofilopoulos, A.N. and Dixon, F.J.: Etiopathogenesis of murine SLE (1981), Immunol. Rev. 55, 179-216

75) Moller, G.: B lymphocyte activation (1981), Immunology Today 2, 181-184

76) Izui, S., Lambert, P.-H., Fournie, G.J., Turler, H., Miescher, P.A.: Features of systemic lupus erythematosus in mice injected with bacterial lipopolysaccharide. Identification of circulating DNA and renal localization of DNA- anti- DNA complexes (1977), J.Exp.Med. 145, 1115-1130

77) Jerne, N.K.: Towards a network theory of the immune system (1974), Ann.Immunol (Paris) 125 C, 373-389

78) Bona, C.A., Heber-Katz, E. and Paul, W.E.: Idiotype-anti-idiotype regulation: I. Immunization with a levan-binding myeloma protein leads to the appearance of auto-anti(anti-idiotype) antibodies and to the activation of silent clones (1981), J.Exp.Med. 153, 951-967

79) Kluskens, L. and Kohler, H.: Regulation of immune response by autogenous antibodies against receptor (1974), Proc.Natl.Acad.Sci. USA 71, 5083-5087

80) Goidl, E.A., Schrater, A.F., Siskind, G.W., Thorbecke, G.J.: Production of auto-anti-idiotypic antibody during the normal immune response to TNP-Ficoll: II. Hapten reversible inhibition of anti-TNP plaque forming cells by immune serum as an assay for auto-anti-idiotypic antibodies (1979), J.Exp.Med. 150, 154-165

81) Cosenza, H.: Detection of anti-idiotype reactive cells in the immune response to phosphorylcholine (1976), Eur.J.Immunol. 6, 114-116

82) Geha, R.S.: Regulation of the immune response by idiotypic-anti-idiotypic interactions (1981), N.Engl.J.Med. 305, 25-28

83) Nemazee, D.A. and Sato, V.L.: Enhancing antibody: A novel component of the immune response (1982), Proc.Natl.Acad.Sci. USA 79, 3828-3832

84) Brewerton, D.A.: HLA-B27 and the inheritance of susceptibility to rheumatic disease (1976), Arthritis Rheum. 19, 656-668

85) Schlosstein, L., Terasaki, P.I., Bluestone, R. and Pearson, C.M.: High association of an HLA-A antigen, W27, with ankylosing spondylitis (1973), N.Engl. J.Med. 288, 704-706

86) Winchester, R.J. and Kunkel, H.G.: The human Ia system (1979), Adv.Immunol. 28, 221-292

87) Lawley, T.J., Hall, R.P., Fauci, A.S., Katz, S.I., Hamburger, M.I. and Frank, M.M.: Defective Fc-receptor functions associated with the HLA-B8 / DRW3 haplotype: Studies in patients with dermatitis herpetiformis and normalsubjects (1981), N.Engl. J.Med. 304, 185-192

88) Lahita, R.G., Bradlow, H.L., Kunkel, H.G., Fishman, J.: Alterations of estrogen metabolism in systemic lupus erythematosus (1979), Arthritis Rheum. 22, 1195-1198

89) Ferell, P.B., Aitcheson, C.T., Pearson, G.R. and Tan, E.M.: Serepidemiological study of relationship between Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis (1981), J.Clin.Invest. 67, 681-687

90) Schaap, O.L., Groot, E.R. de, Loghem, J.J. van: Failure to induce autoimmune phenomena in mice by administration of highly purified C-type particles from NZBmice (1975), Pathol.Microbiol. 42, 171-187

91) Elder, J.H., Jensen, F.C., Bryant, M.L. and Lerner, R.A.: Polymorphism of the major envelope glycoprotein (gp 70) of murine C-type viruses: Virion associated and differentiation antigens encoded by a multi-gene family (1977), Nature 267, 23-28

92) Izui , S., Elder, J.H., McConahey, P.J. and Dixon, F.J.: Identification of retroviral gp70 and anti-gp70 antibodies involved in circulating immune complexes in NZBxNZW mice (1981), J.Exp.Med. 153, 1151-1160

93) Izui, S., McConahey, P.J., Theofilopoulos, A.N. and Dixon, F.J.: Association of circulating retroviral gp70-anti-gp70 immune complexes with murine systemic lupus erythematosus (1979), J.Exp.Med. 149, 1099-1116

94) Andrews, B.S., Eisenberg, R.A., Theofilopoulos, A.N., Izui, S., Wilson, C., McConahey, P.J., Murphy, E.D., Roth, J.B. and Dixon, F.J.: Spontaneous murine lupus-like syndrome. Clinical and immunopathological manifestations in several strains (1978), J.Exp.Med. 148, 1198-1215

95) Weber, K. and Osborn, M.: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate - polyacrylamide gel elektrophoresis (1969), J.Biol. Chem. 244, 4406-4412

96) Fairbanks, G., Steck, T.L. and Wallach, D.F.H.: Elektrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane (1971), Biochemistry 10, 2606-2617

97) Bauer, D.C., Mathies, M.J. and Stavitsky, A.B.: Sequences of synthesis of γ_1-macroglobulin and γ_2-globulin antibodies during primary and secondary responses to proteins, Salmonella antigens, and phage (1963), J.Exp.Med. 117, 889-907

98) Deinhardt, F., Rosendahl, C. and Julg, W.: Virushepatitis bei Neugeborenen (1983), Laboratoriumsblätter 4, 139-146

99) Gross, R. und Schölmerich, P.: Lehrbuch der Inneren Medizin (1982), Schattauer Stuttgart

LEBENSLAUF

Name	Richard Linde
geboren	19. Juni 1950
Geburtsort	Herbstein
Eltern	Luise Linde geb. Traud Lothar Linde

AUSBILDUNG

1956 - 1961	Grundschule Darmstadt-Eberstadt Ludwig-Schwamb-Schule
1961 - 1966	Realschule Darmstadt-Eberstadt Gutenbergschule
1966 - 1969	Gymnasium Darmstadt Lichtenbergschule
1969	Abitur
WS 1969/70	Beginn des Biologiestudiums an der Technischen Hochschule Darmstadt
WS 1974/75	Diplomprüfung
1975/76	Diplomarbeit bei Prof. Dr. H. G. Gassen am Institut für Organische Chemie und Biochemie, Fachgebiet Biochemie, der Technischen Hochschule Darmstadt
1976 - 1978	Promotionsarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. H.G. Gassen am gleichen Institut
SS 1977	Beginn des Medizinstudiums an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt
März 1979	Physikum
März 1980	erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
März 1982	zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

1982 - 1983	Praktisches Jahr an dem Klinikum der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität mit Neurologie als Wahlfach
April 1983	Abschluß des Studiums mit dem dritten Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Juni 1983	Aufnahme einer experimentellen Promotionsarbeit im Fachgebiet Rheumatologie unter Anleitung von Dr. Krippner

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit an Eides statt, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

Versuche zum Einsatz der Elisa-Diagnostik in der Anti Typ IV Kollagen-Bestimmung bei rheumatischen Krankheitsbildern

in der Abteilung für Physikalisch-Diätetische Therapie der Johann Wolfgang Goethe-Universität unter Leitung von Herrn Prof. Dr. K. Pirlet ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät bzw. Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main, den 25.3.1984

Richard Lille